

Aus der Urologischen Klinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

EINFLUß VON LEKTINEN UND ZYTOSTATIKA AUF ZELLKULTUREN
VON NORMALNIEREN UND NIERENZELLKARZINOMEN SOWIE DER
BLASENTUMORZELLINIE KK-47 UNTER VERWENDUNG EINES
IN VITRO DNS/RNS-PRECURSORASSAYS

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

JÜRGEN SCHMIDT

aus Wiesbaden

Mainz, im Frühjahr 1987

Aus der Urologischen Klinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

EINFLUß VON LEKTINEN UND ZYTOSTATIKA AUF ZELLKULTUREN
VON NORMALNIEREN UND NIERENZELLKARZINOMEN SOWIE DER
BLASENTUMORZELLINIE KK-47 UNTER VERWENDUNG EINES
IN VITRO DNS/RNS-PRECURSORASSAYS

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

JÜRGEN SCHMIDT

aus Wiesbaden

Mainz, im Frühjahr 1987

1 EINLEITUNG

1.1 Charakterisierung des Gegenstandes 1

1.1.1 Allgemeine Begriffe 2

1.1.2 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 3

1.1.2.1 Spezialisierte Begriffe bei Df. 1 4

1.1.2.2 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 5

1.1.3 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 6

1.1.4 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 7

1.1.5 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 8

1.2 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 9

1.2.1 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 10

1.2.2 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 11

1.2.3 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 12

1.2.4 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 13

Tag der Promotion: 10. Juni 1987

1.2.5 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 14

1.2.6 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 15

1.2.7 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 16

1.2.8 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 17

1.2.9 Charakterisierung des Gegenstandes
Begriffe: Funktion (Df. 1) und Objekt
produktiver (Df. 2) 18

Dekan: Professor Dr. M. Thelen

1. Gutachter: Professor Dr. P. Alken

2. Gutachter: Privatdozent Dr. H. Riedmüller

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Charakterisierung der eingesetzten Lektine	2
1.1.1	Allgemeine Aspekte	2
1.1.2	Charakterisierung der Lektine Ricinus communis (RCA) und Abrus praecatorius (APA)	3
1.1.2.1	Spezielle Aspekte bei APA	6
1.1.3	Charakterisierung des Lektins Concanavalin A	8
1.1.4	Charakterisierung des Lektins Wheat Germ Agglutinin	11
1.1.5	Charakterisierung des Lektins Soybean Agglutinin	12
1.1.6	Charakterisierung des Lektins Peanut Agglutinin	13
1.2	Charakterisierung der eingesetzten Zytostatika	15
1.2.1	Charakterisierung von ADRIAMYCIN (ADRIBLASTIN ^R)	15
1.2.1.1	Wirkungsmechanismus	16
1.2.1.2	Klinische Verwendung	16
1.2.2	Charakterisierung von VINDESIN-SULFAT (ELDISINE ^R)	17
1.2.3	Charakterisierung von MITOMYCIN (MITOMYCIN medac ^R)	18
1.2.4	Charakterisierung von CISPLATIN (PLATINEX ^R)	19
1.2.5	Charakterisierung von CHLAMYDOCIN	21



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555001_0029

		Seite
2	MATERIAL	23
2.1	Versuch der Etablierung von Blasen- tumorzelllinien	23
2.2	Blasentumorzelllinie KK-47	23
2.3	Hypernephroide Nierenzellkarzinome	24
2.4	Verwendete Materialien, Geräte und Medien	25
2.4.1	Sterile Kunststoffeinmalmaterialien	25
2.4.2	Glaswaren	26
2.4.3	Filterpapier und Szintillations- flüssigkeit	26
2.4.4	Verwendete Zytostatika, Lektine, Zucker, Nährmedien sowie andere Chemikalien und Hilfsstoffe	26
2.4.4.1	Zytostatika	26
2.4.4.2	Lektine	26
2.4.4.3	Zucker	27
2.4.4.4	Radioaktivität	27
2.4.4.5	Vitalitätsfärbung	27
2.5	Nährmedium	28
2.6	Verwendete Geräte	29
3	METHODE	30
3.1	Testung mit Blasentumorzelllinie KK-47	30
3.1.1	Gewinnung der Zellen aus der Zellkultur	30
3.1.2	Weiterer Versuchsablauf	30
3.1.3	Beendigung des Versuchs	31
3.1.4	Hemmungsversuche mit Zuckern bei Lektinen	34

	Seite
3.2	Testung von Nierenzellkarzinomen 35
3.2.1	Zellgewinnung aus Tumorgewebe 35
3.2.2	Zellzählung 36
3.2.3	Kultivierung und Testung 36
3.2.4	Beendigung des Versuchs 36
3.2.5	Testung von Zytostatika und Lektinen 37
3.3	Mikroskopische Untersuchungen der eingesetzten Zellen 40
4	ERGEBNISSE 41
4.1	Kinetikversuche 41
4.1.1	Kinetikversuche mit KK-47-Zellen 41
4.1.2	Kinetikversuche mit hypernephroiden Nierenkarzinomzellen 41
4.2	Einbaustudien an KK-47-Zellen 43
4.2.1	Einbaustudien an KK-47-Zellen unter dem Einfluß von Lektinen 43
4.2.1.1	RCA II 43
4.2.1.2	WGA 43
4.2.1.3	CON A 43
4.2.1.4	APA 44
4.2.1.5	PNA 44
4.2.1.6	SBA 44
4.2.2	Hemmungsversuche mit Zuckern bei Lektinen 45
4.2.2.1	Vorversuch 45
4.2.2.2	Hemmung von RCA II mit Galaktose 46
4.2.2.3	Hemmung von WGA mit NAc-Glc 46
4.2.2.4	Hemmung von CON A mit Mannose 46
4.2.2.5	Hemmung von APA mit Galaktose 47
4.2.2.6	Hemmung von PNA mit Galaktose 47
4.2.2.7	Hemmung von SBA mit Galaktose 47

4.2.3	Einbaustudien an KK-47-Zellen unter dem Einfluß von Zytostatika	48
4.2.3.1	Versuche mit ADRIBLASTIN ^R (ADB)	48
3.2.3.2	Versuche mit CHLAMYDOCIN	48
4.2.3.3	Versuche mit ELDISINE ^R , MITOMYCIN ^R und PLATINEX ^R	49
4.3	Einbaustudien an Hypernephromen und normalen Nierenzellen	50
4.3.1	Einbaustudien unter dem Einfluß von Lektinen	50
4.3.2	Einbaustudien unter dem Einfluß von Zytostatika	51
5	DISKUSSION	69
5.1	Diskussion der Methode	69
5.1.1	In-vivo-Testmethoden	69
5.1.1.1	Diffusionskammersystem	70
5.1.1.2	Heterotransplantationsmodelle	70
5.1.1.3	Heterotransplantation unter die Nierenkapsel immunkompetenter Mäuse	71
5.1.1.4	Vorteile von in-vivo-Modellen	71
5.1.1.5	Nachteile von in-vivo-Modellen	71
5.1.2	In-vitro-Testmethoden	72
5.1.2.1	Morphologische Tests	72
5.1.2.2	Tests, die die Zellebensfähigkeit messen	73
5.1.2.3	Messung der primären Angriffspunkte von Zytostatika	73
5.1.2.4	Messung der Inhibition des zellulären Metabolismus	74
5.1.2.5	Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen in DNS bzw. RNS	74
5.1.2.6	Messung der Reproduktionsfähigkeit	75

	Seite
5.1.3	Auswahl des Testsystems 76
5.2	Diskussion der Ergebnisse 78
5.2.1	Diskussion der Lektinergebnisse von KK-47-Zellen 78
5.2.1.1	Diskussion der Zuckerhemmungsversuche mit Lektinen 80
5.2.2	Diskussion der Einflüsse von Zytostatika auf KK-47-Zellen 81
5.2.2.1	ADRIPLASTIN ^R 81
5.2.2.2	ELDISINE ^R 81
5.2.2.3	PLATINEX ^R 81
5.2.2.4	MITOMYCIN ^R 81
5.2.2.5	CHLAMYDOCIN 82
5.2.3	Diskussion der Einflüsse von Lektinen auf die Hypernephromzellen 82
5.2.4	Diskussion der Einflüsse von Zytostatika auf die Hypernephromzellen 84
5.3	Schlußfolgerungen und Ausblick 86
6	ZUSAMMENFASSUNG 87
7	LITERATURVERZEICHNIS 89

1 EINLEITUNG

Nieren- und Blasentumoren nehmen einen großen Teil der urologischen Tumoren ein. Ca. 30 % der hypernephroiden Nierenkarzinome haben bei Diagnosestellung bereits solitäre Metastasen und weitere 30 % Mikrometastasen gesetzt. Deshalb ist es wichtig, neben der operativen Therapie auch adjuvante systemische Therapiekonzepte zu entwickeln. Unbehandelt überleben fünf Jahre nur 1,7 %, nach Tumor-nephrektomie 41 % der Patienten (SUFRIN, 1980).

Neben der Zytostatikatherapie wurden Hormon- und Immuntherapien eingesetzt (McCUNE, 1981; STEELE, 1981; DROLLER, 1985; ALBERTO, 1974). Die Ansprechraten liegen für die Hormontherapie bei 4 bis 5 % (ALBERTO, 1974), die Zytostatikatherapie bei 20 bis 30 % (TALLEY, 1973; LIEBER, 1984; HRUSHESKY, 1977; MERRIN, 1975). Für den Bereich der Immuntherapie werden Ansprechraten von ca. 20 % angegeben (DROLLER, 1985).

MITOMYCIN^R, ADIRIBLASTIN^R, PLATINEX^R und VINCA ALKALOIDE sind beim metastasierenden Blasenkarzinom wirksam, wobei PLATINEX^R 33 bis 47 % Teilremissionen zeigte (YAGODA, 1980; STERNBERG, 1985).

Obwohl auf dem Gebiet der Chemotherapie in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt wurden, blieben sie sowohl beim hypernephroiden Karzinom als auch bei Blasentumoren bisher unbefriedigend. Ein oft nur minimaler Therapieerfolg wird mit hohen Nebenwirkungen der Behandlung erkauft.

Um den Tumor des Patienten suffizient zu behandeln und unnütze Belastungen verhindern zu können, begann man schon vor 30 Jahren, Testmethoden für die Tumorsensibilität gegen Zytostatika zu entwickeln. Das Ziel aller Testverfahren ist es, möglichst genau die Sensibilität bzw. Resistenz von Tumoren gegenüber zytostatisch wirkenden Substanzen zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, mit Hilfe eines H^3 -Thymidin/ H^3 -Uridin-Procursor-Assays, der über den Einbau von Thymidin bzw. Uridin in die Zellen die DNS- bzw. RNS-Aktivität mißt, die Wirkung von Zytostatika und Lektinen auf das Hypernephrom, auf normales Nierengewebe und auf die Blasentumorzelllinie KK-47 zu untersuchen.

Außerdem soll versucht werden, ein möglichst einfaches Testsystem zur individuellen Chemotherapeutikatestung urologischer Tumoren zu entwickeln.

1.1 Charakterisierung der eingesetzten Lektine

1.1.1 Allgemeine Aspekte

STILLMARK beschrieb 1888 als erster das Phänomen der Haemagglutination durch Pflanzenextrakte. Er fand die Substanz bei der Beobachtung der Herstellung von Rizinusöl. Er beobachtete neben der Haemagglutination auch eine hohe Toxizität eines Proteins, das er RICIN nannte.

In den 90er Jahren des vorigen Jahrhunderts entwickelte EHRLICH grundlegende immunologische Erkenntnisse unter Verwendung der Stoffe RICIN und ABRIN. In den 40er Jahren wurde mit Hilfe von Lektinen die Blutgruppenantigenität erforscht (SHARON, 1972; ROTH, 1978).

Erst 1954 führte BOYD den Namen "LEKTIN" ein (LEKTIN: lat. legere = heraussuchen, auswählen). Der Begriff LEKTIN wird wie folgt definiert: "Zuckerbindendes Protein oder Glykoprotein von nicht immuner Herkunft, das Zellen agglutiniert und/oder Glykokonjugate präzipitiert. LEKTINE besitzen mindestens 2 Zuckerbindungsstellen." (GOLDSTEIN, 1980).

Im allgemeinen stellen Lektine Glykoproteine dar. Ausnahmen hiervon bilden CON A (Canavalina ensiformis), WGA (Triticum vulgare) und PNA (Arachis hypogaea), die keine Zuckerreste besitzen und deshalb Proteine sind (ROTH, 1978).

Im Tierreich wirken Lektine beim Wachstum von Wirbeltieren bei interzellulären Interaktionen während der Gewebedifferenzierung mit (BARONDES, 1981). Lektine sind auch an der rezeptorvermittelten Pinozytose zu Beginn des weiteren Katabolismus von partiell gespaltenen Glykoproteinen beteiligt (BARONDES, 1981).

Es wird angenommen, daß Lektine das Größenwachstum von Pflanzen beeinflussen können (KAUSS, 1974). Folgende Funktionen im Tier- und Pflanzenbereich werden für Lektine u.a. postuliert: Antimikrobielle Ak-Bildung bei Pflanzen, Kohlenhydrattransport, Speicherung von Proteinen, enzymatische Wirkungen mit unbekannter Aktivität, die kohlenhydratspezifisch sind (ROTH, 1978).

Auch in Zellbiologie und Tumorforschung stoßen Lektine auf großes Interesse. Die Fähigkeit von Lektinen, selektiv maligne Zellen in viel niedrigeren Konzentrationen wie Normalzellen zu agglutinieren, wurde zuerst mit WGA gezeigt (AUB, 1963).

Tumorselektive therapeutische Effekte im Tierversuch, an Zellkulturen und beim Menschen können der Tumorforschung neue Impulse geben (HSU, 1974; ZEILE, 1985).

Im folgenden werden die im Versuch verwendeten Lektine (RCA, APA, CON A, WGA, PNA, SBA) charakterisiert.

1.1.2 Charakterisierung der Lektine *Ricinus communis* (RCA) und *Abrus praecatorius* (APA)

Da es sich bei diesen beiden Lektinen um sehr ähnliche Stoffe handelt, sollen sie hier zusammen dargestellt werden.

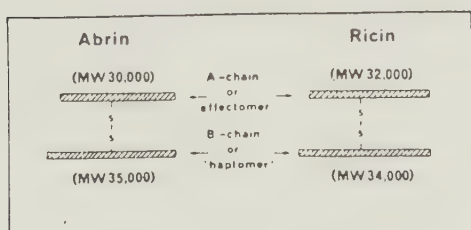
RCA ist das erste näher charakterisierte Lektin, das von STILLMARK 1888 aus Rizinussamen extrahiert wurde. Die Substanz wirkt *toxisch* auf Mäuse und ist in der Lage, *Erythro-*

cyten zu agglutinieren. Die Rizinussamen enthalten zwei Lektine: RCA I Mol.Gew. 120 000 und RCA II Mol.Gew. 60 000 bis 65 000. Sie wurden von NICOLSON 1974 gereinigt dargestellt. Die toxische Wirkstoffkomponente heißt RICIN. Die beiden Ricinus-Lektine scheinen aus einer gleichen und einer unterschiedlichen Untereinheit zusammengesetzt zu sein. Sie haben ein gemeinsames Peptid mit einem Mol.Gew. von 29 000.

Bei RCA I handelt es sich um ein Tetramer des $\alpha_2\beta_2$ -Typs, welches in zwei Hauptpeptide aufgespalten werden kann (Mol.Gew. 29 500 und 37 000).

RCA II ist ein Dimer des α,β -Typs, welches Peptide mit einem Mol.Gew. von 29 500 und 34 000 enthält (NICOLSON, 1974; GÜRTLER, 1973).

Disulfidbrücken verbinden die Untereinheiten des Tetramers und des Dimers (GÜRTLER, 1973; OLSNES, 1975). Das intakte Ricinus-Lektin ist sehr resistent gegen tiefe Temperaturen, die Exposition von proteolytischen Enzymen und ist in einem breiten Ph-Bereich stabil. Die beiden Ketten allein sind nicht resistent gegenüber den oben angegebenen Faktoren. RCA I und II sind spezifisch für Saccharide mit Hydroxylgruppen an C 2,3,4 (ähnlich Galaktose), die als starke Inhibitoren anzusehen sind (NICOLSON, 1972, 1974). H- und OH-Gruppen an C 2,3,4 werden als Positionen für die Zuckerbindung angesehen (DRYSDALE, 1968). RCA II ist in einem weiteren Bereich zuckerbindungs-spezifisch und hat einen Kohlenhydratanteil des Gesamtproteingehalts von 8 bis 9 %, wobei es reich an Mannose ist (PODDER, 1974).



(OLSNES, 1976)

Die Disulfidbrücken sind für die toxischen Wirkungen *in vivo* und *in vitro* notwendig, da Gemische von reduzierten Ketten *in vivo* nicht toxisch sind. Die Toxizität kehrt mit der Ausbildung der Disulfidbrücken zurück (OLSNES, 1976). Bei der Befreiung von der B-Kette ändert die A-Kette ihre Konformation umfassend (OLSNES, 1975). Die Ricinus-B-Kette bindet sich an die Zellen, ähnlich wie das intakte Ricinus-Lektin (LIN, 1970) und kann an sie gebundene Stoffe zur Zelloberfläche "leiten" (BASU, 1983).

An EHRLICH-Ascites-Tumorzellen konnte eine starke Inhibition der Proteinbiosynthese beobachtet werden. Dabei zeigten sich normale Rattenleberzellen erheblich resistenter gegenüber dem Toxin (LIN, 1971). Weitere Untersuchungen zeigten, daß die nur agglutinierten Zellen noch lebendig waren, was darauf hinweist, daß die Bindung allein für die Protein- und DNA-Synthesehemmung noch nicht ausreichend ist (LIN, 1973). Zusätzliche Faktoren müssen für die zytotoxische Wirkung verantwortlich sein. Die Möglichkeit, RCA II noch bis zu 15 Minuten nach Bindung an die Zelle in seiner Wirkung zu hemmen, zeigt an, daß RCA II erst in die Zelle eindringen muß, um die Protein-synthese hemmen zu können (NICOLSON, 1975).

Aus diesen Beobachtungen heraus wurde folgender Lektin-aktionsmechanismus postuliert (NICOLSON, 1975):

1. Bindung des Lektins an die Zelloberfläche
2. Lektin-induzierte Zellagglutination
3. Endozytose der RCA-Moleküle, gebunden an ihre Rezeptoren
4. Freisetzung von RCA aus endocytischen Vesikeln in das Cytoplasma
5. Interaktion von RCA mit Polyribosomen, was eine Inhibition der Proteinsynthese bewirkt.

RCA II hat einen primären Angriffspunkt an den Ribosomen. Es wirkt über die Inhibition der Kettenelongation. Der Effekt scheint als mehr katalytisch anzusehen zu sein (NICOLSON, 1975).

Bei der Verwendung von Ricin im Tierversuch erwiesen sich 65 ng in der Maus als letale Dosis.

Interessanterweise ließ sich die Überlebenszeit auch bei weiter ansteigenden Dosen nicht unter zehn Stunden drücken (OLSNES, 1976). Bei EHRLICH-Ascites-Tumor-tragenden Mäusen konnte bei frühzeitiger Behandlung ein vollkommenes Verschwinden des Tumors beobachtet werden. Bei späterer Anwendung hingegen konnte nur ein Stillstand im Tumorstadium erreicht werden (OLSNES, 1975; LIN, 1970). Auch die vereinzelte Anwendung am Menschen erbrachte ermutigende Ergebnisse. Die intravenöse Gabe von RCA bei inkurablen Karzinompatienten erbrachten in Einzelfällen Teilremissionen. Dabei wurden weder inhibitorische Effekte auf das hämatopoetische System noch eine Beeinträchtigung von Nieren- und Leberfunktion beobachtet (HSU, 1974).

1.1.2.1 Spezielle Aspekte bei APA

Bei Abrin handelt es sich um ein Lektin, das aus *Abrus precatorius* (Indian liquorice = indisches Süßholz) gewonnen wird. Es wurde von HELLIN 1891 entdeckt. Das Lektin hat ein Mol.Gew. von 65 000 und besteht aus zwei Polypeptidketten (A- und B-Kette), die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die *toxische Wirkung* auf die Proteinsynthese läßt sich sowohl an intakten Zellen als auch im zellfreien Milieu nachweisen. Im zellfreien Milieu ist die A-Kette für die toxische Wirkung verantwortlich. Sie wird durch Reduktion der Zwischenkettendisulfidbrücke aktiviert (OLSNES, 1976). Das Ziel der A-Ketten-Wirkung ist die 60-s-Ribosomenuntereinheit, die irreversibel inaktiviert wird (SPERTI, 1973). Es wird angenommen, daß die

A-Kette ein Enzym darstellt, das in der Lage ist, in Retikulozytenlysaten 150 Ribosomen pro Minute zu inhibieren (OLSNES, 1976).

Bei den B-Ketten scheint es sich um den Lektinanteil zu handeln, der fest an die Zellmembranrezeptoren bindet. Die Rezeptoren sind Glykoproteine mit Kohlenhydratketten, an deren Enden sich nicht reduzierende Galaktosereste befinden. Es hat sich gezeigt, daß die B-Ketten eine Bindungsstelle pro Molekül besitzen (OLSNES, 1974). Die Zucker Galaktose und Lactose sind wie bei Ricin in der Lage, die Wirkungen zu inhibieren, wenn sie vor dem Toxin an die Zelloberfläche gelangen (PAPPENHEIMER, 1974).

Bei Bindungsversuchen stellte sich heraus, daß immer nur dieselbe Menge von Toxin an die Zellen gebunden wird, auch wenn sich das Angebot bis zum 300fachen ändert (OLSNES, 1976).

Bei der Toxinwirkung wurde ein Intervall zwischen Abgabe und Beginn der toxischen Wirkung festgestellt. In der Phase der Bindung an die Zellmembran kann die Wirkung durch Antikörper oder Zucker gehemmt werden. Die darauffolgende irreversible Phase wird als pinocytoseartiges Eindringen in die Zelle angesehen (OLSNES, 1974). Der Wirkungseintritt ist - wie auch bei Ricin - mit hohen Dosen nicht unter ein gewisses Maß zu drücken. Dieser Zeitraum wird mit Transport- und Freisetzungsprozessen erklärt (OLSNES, 1974). Der Aufnahmemechanismus in die Zelle ist letztlich noch nicht geklärt, und es werden andere Mechanismen wie z.B. die bei Hormonen diskutiert (OLSNES, 1976).

Im Tierversuch hat sich Abrin als hochpotentes Toxin erwiesen. Bereits 12 ng i.V. sind für Mäuse nach wenigen Tagen letal. Bakterien gegenüber zeigten sich keine Effekte (OLSNES, 1976).

Abrin und Ricin haben sich als hochpotente Proteinsyntheseinhibitoren erwiesen, deren Struktur und Wirkungsmechanismen große Ähnlichkeiten aufweisen.

1.1.3 Charakterisierung des Lektins Concanavalin A

CON A wird aus *Canavalia ensiformis* (Jack bean = Johannisbohne) gewonnen, hat ein Mol.Gew. von 105 000 und besteht aus vier Untereinheiten. Bei Ph 7,0 tritt eine Dimerisation und zeitabhängige Trübung ein. Befindet sich der Ph bei 7,0, so findet man CON A als nichtinteragierende Mischung von Dimer und Tetramer vor, was annehmen läßt, daß Dimer und Tetramer signifikant unterschiedliche Bindungsaffinitäten haben (McKENZIE et al., 1973). Die Temperaturabhängigkeit dieses Stoffes zeigt das Vorliegen eines Tetramers bei 37 °C und die Spaltung in Dimere unter 37 °C (GORDON, 1974).

Man findet Substrukturproteine, die aus identischen, asymmetrischen Untereinheiten (Protomer) mit einem Mol.Gew. von 25 000 zusammengesetzt sind (WANG, 1971). Das intakte Protomer besteht aus 237 AS-Ketten (EDELMANN, 1972). Die terminale Aminogruppe der Polypeptidkette hat eine Säureregion, in der die meisten Liganden für Metallionen lokalisiert sind. Das CON A-Molekül ist ein Tetramer mit gleichen Untereinheiten, von denen jede eine einzelne Polypeptidkette mit 231 Aminosäureresten hat. Die CON A-Struktur beinhaltet keine Helix.

An symmetrisch äquivalenten Positionen am tetrameren Protein können vier Zucker gebunden werden. Die Bindungsstelle erscheint als eine Höhlung und wird gebildet von einer in einer Untereinheit befindlichen Polypeptidkette. Es liegen Hinweise dafür vor, daß die Bindungsstelle im Kristall nicht dieselbe ist wie in der Lösung (HARDMAN, 1973).

CON A ist in der Lage, *Leukämiezellen und durch Viren erzeugte Tumorzellen zu agglutinieren*. Dabei zeigte es sich, daß solide Tumorzellen (z.B. Sarkomzellen) mehr als Leukämiezellen agglutiniert werden (LIN, 1975). Interessanterweise *agglutiniert es keine Normalzellen*, wenn deren Oberfläche nicht enzymatisch, z.B. durch Trypsin, verändert wurde (INBAR, 1969). Nach der Behandlung von transformierten Zellen mit monovalentem CON A (Konzentration 20 bis 66 µg/ml), konnte die Wachstumsfähigkeit/-geschwindigkeit auf das Maß von Normalzellen gemindert werden (BURGER, 1970). Die Effekte auf das Tumorstadium scheinen nicht konstant zu sein, gleichen sich aber bei intermittierender und konstanter Behandlung. Es zeigte sich kurzfristig auch eine *Zunahme der mitotischen Aktivität* (GUNTHER, 1974).

Als Wirkungsmechanismus wird folgender Effekt angesehen: Zellen besitzen an der Oberfläche Pseudopodien, die sich im ständigen Wandel befinden. CON A bewirkt eine Retraktion und Abrundung der Zellen unter Ausbildung von scharfen glatten Grenzen. Dadurch wird die Aminosäureaufnahme verhindert. Dieser Effekt ist trotz Ausspülens von CON A noch einige Stunden nachweisbar. Die normale Motilität wird vollkommen aufgehoben (CHOWDHURY, 1974). Der spezifische Inhibierungseffekt von CON A auf den Aminosäureeinbau mag tatsächlich auf die Interaktion des Lektins mit speziellen "Carrier-Molekülen" an speziellen Transportwegen zurückzuführen sein (INBAR, 1971).

Nach mehrstündiger Inkubation mit Medium können die Zellen später wieder ihre normale Funktion erreichen. Bei als Vergleichszellen eingesetzten Fibroblasten wurden keine Veränderungen festgestellt. Bei der Testung mit H^3 -Thymidin ergaben sich Minderungen beim Kerneinbau der Tumorzellen. Der Effekt von CON A auf den Thymidin-Einbau erfolgt auf zwei Ebenen:

1. Die Permeation durch die Zellmembran wird inhibiert.
2. CON A wirkt auf den Nucleus durch Verminderung der Nukleinsäure-Membran-Permeabilität oder Verminderung der de novo-Synthese (CHOWDHURRY, 1974).

Bei zytoelektrischen Untersuchungen wurden Änderungen im intrazellulären Potential gemessen, die zu einer Verminderung der Transmembranresistenz führen. Interessanterweise nähert sich die Resistenz der von unbehandelten Normalzellen an (CHOWDHURRY, 1973).

Im Tierversuch zeigte sich eine Verlängerung der Überlebenszeit und ein verzögertes Anwachsen der Tumorzellen unter bzw. nach Behandlung mit CON A. Dabei fiel eine lange Latenz zwischen Gabe und Wirkungseintritt auf (INBAR, 1972).

Als Nebenwirkungen im Tierversuch wurden bei Mäusen und Hunden subepitheliale Hämorrhagien im Duodenum und Jejunum sowie Diarrhoen festgestellt. Bei höheren Dosen traten Lungenödem und Rechtsherzinsuffizienz auf. Im pathologisch-anatomischen Bild fand sich eine Vasculitis in Lunge, Niere, Leber, Herz und Intestinum. Bei den überlebenden Tieren konnten diese Nebenwirkungen weder blutchemisch noch im Zeitraum von einer Woche bis zu einem Monat nachgewiesen werden (LIN, 1975).

Mit DAUNOMYCIN konjugiertes CON A hatte bessere Wirkungen auf Sarkomzellen als CON A allein oder bei unkonjugierter Gabe mit DAUNOMYCIN. Bei der Gabe von CON A allein fiel die Mitogenität gegenüber Lymphozyten auf (KITAO, 1977).

Bei Lymphomzellen wurde eine maximale Agglutination der Zellen bei 125 bis 500 µg/ml festgestellt. Die Zytolyse begann 12 Stunden nach Zugabe des Proteins. Die Zuckergabe von 0,1 mol. Mannose konnte die toxischen Effekte in einem hohen Maß hemmen (INBAR, 1972).

1.1.4 Charakterisierung des Lektins

Wheat Germ Agglutinin

Die unreine Substanz wurde aus *Triticum vulgare* (Wheat germ = Weizenkeim) gewonnen (AUB, 1963). Die Substanz wurde von BURGER und GOLDBERG 1967 rein dargestellt.

Bei WGA scheint es sich um ein relativ einfaches Protein zu handeln, was kohlenhydratfrei ist (NAGATA, BURGER, 1972). Bei Aminosäureanalysen zeigen sich hohe Anteile von Halbcystin und Glycin (NATAGA, 1972). Außerdem finden sich hohe Anteile an Asparaginsäure und Glutaminsäure (ALLEN, 1973). Das Mol.Gew. bewegt sich zwischen 17 000 bis 35 000, wobei das untere bei pH von 3,5, das obere bei pH von 7,0 auftritt (NAGATA, 1972).

Bei physiologischem Ph liegt WGA als Dimer vor (NAGATA, 1974). Die Untereinheit ist aus einer Polypeptidkette mit 165 ± 12 Aminosäureresten zusammengesetzt (NAGATA, 1974). WGA hat zwei unabhängige Zuckerbindungsstellen, wenn es in monomerer Form vorliegt, die für N-Acetyl-D-Glucosamin und seine $\beta(1-4)$ gebundenen Oligomeren spezifisch sind (NAGATA, 1974). Es interagiert mit Biopolymeren, die diese Sequenzen enthalten (BURGER, GOLDBERG, 1967). Es hat sich gezeigt, daß Disaccharide 600mal, Trisaccharide 3000mal mehr inhibitorisch wirken als Monosaccharide (ALLEN, 1973).

An murinen Mastrozytomzellen konnte gezeigt werden, daß sich WGA während der Telophase an die Spaltungsfurche der sich teilenden Zelle anlagert. Darauf folgt eine osmotische Schwellung und Lyse der Zelle (LUSTIG, 1980).

An Ascites-Zellen eines Mamma-Carcinoms konnte eine Inhibition des H^3 -Thymidin-Einbaus in die Tumorzelle (nach WGA-Exposition) gemessen werden. Dies zeigt an, *daß WGA die Tumorphosphorproliferation hemmen kann* (ESUMI-KURISU, 1983).

Es wird angenommen, daß WGA wie folgt wirkt:

Induzierung der Anlagerung von Tumorzellen an Makrophagen durch "Überbrückung" der N-Acetyl-Glucosamin-Gruppe der

jeweiligen Glykoproteine (ESUMI-KURISU, 1983). Dabei wird WGA als Ligand der makrophagenvermittelten Cytolyse angesehen. Andere Versuche ergaben, daß neben WGA auch CON A, PHA und SBA eine Zytoadherenz erzeugen, jedoch nur WGA zur Zytolyse führte (KURISU, 1980). Dies läßt darauf schließen, daß die alleinige Bindung für die Zytolyse nicht ausreicht und noch andere Faktoren dafür notwendig sind. Bei der lektininduzierten makrophagenvermittelten Zytolyse wurden WGA-Rezeptoren auf der Makrophagen-Membran festgestellt, die an der Zytolyse beteiligt sind (KURISU, 1980). Aus dem T-Zell-System ist bekannt, daß das Lyseereignis durch den Rezeptor selbst zu Ende geführt wird und nicht nur durch einfachen Kontakt zwischen Ziel- und Effektorzelle ausgelöst wird (GENSHEIMER, 1978). Bei der WGA-induzierten Zytolyse scheint ein spezielles "Signal" vorzuliegen, was bei CON A, SBA u.a. nicht vorhanden ist. Eine andere Möglichkeit wäre die zytoprotektive Wirkung von CON A u.a., obwohl es zur Zytoadherenz kommt. Die Zytoadherenz läßt sich bei WGA durch den spezifischen Zucker NAc-Glc hemmen (KURISU, 1980).

1.1.5 Charakterisierung des Lektins Soybean Agglutinin

SBA (*Glycine max.*) wird aus der Sojabohne gewonnen und wurde 1952 von LIENER und PALLANSCH gereinigt dargestellt. Es handelt sich dabei um ein Glykoprotein, das 4,5 % Mannose und 1,5 % N-Acetyl-D-Glucosamin enthält (WADA, 1958; LIS, 1966).

SBA ist ein Tetramer, das aus identischen Untereinheiten besteht. Die Untereinheiten haben ein Mol.Gew. von je 30 000. Zwei Peptidketten besitzen einen N-terminalen Alaninrest und haben ein Mol.Gew. von 95 000. Es sind zwei Zuckerbindungsstellen vorhanden, die spezifisch für 2-acetamido-2-deoxy-D-Galaktose und D-Galaktose sowie deren Oligosaccharide sind (LIS, 1970; PEREIRA, 1974). Normalerweise entspricht die Zahl der Bindungsstellen der Zahl der

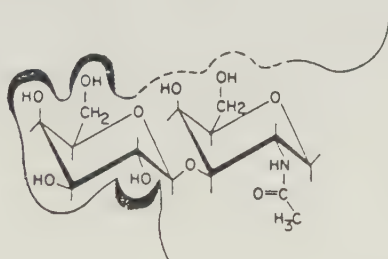
Untereinheiten. SBA scheint diesbezüglich eine Ausnahme darzustellen. Es konnten vier Isolektine dieses Lektins hergestellt werden (LIS, 1966).

SBA kann durch Guanidin, Harnstoff, Pepsin, tri- bzw. quadrivalente Metallionen und seinen spezifischen Zucker (D-Galaktose, NAcGal) inaktiviert werden (LIENER, 1958).

Bei Versuchen mit *Neuroblastom-* und *Leukämiezellen* konnten *Agglutinationen* zwischen SBA und diesen Zellen festgestellt werden. Dabei fiel auf, daß die SBA-Interaktion nicht vom Zellzyklus abhängig ist (REISNER, 1983).

1.1.6 Charakterisierung des Lektins Peanut Agglutinin

Dieses Lektin wurde von LOTAN 1975 aus der Erdnuß (*Arachis hypogaea*) gereinigt dargestellt. Vier gleiche Untereinheiten bilden ein Tetramer mit einem Mol.Gew. von 110 000. Die Untereinheiten haben ein Mol.Gew. von je 27 500. Das Lektin beinhaltet kovalent gebundene Zucker. PNA bindet bevorzugt an Oligosaccharide, die die terminale Sequenz β -D-galactosyl (1-3)-N-acetyl-D-galaktosamin aufweisen (UHLENBRUCK, 1969). Es ist außerdem für D-Galaktose spezifisch (LOTAN, 1975).



Hypothetical structure of the sugar binding site in peanut agglutinin. The sites of protein-sugar interactions are marked. The broken line represents the suggested extension of the binding site that interacts with the penultimate *N*-acetylgalactosamine.

(LOTAN, 1975)

Auf embryonalen Teratomcarciomzellen konnten "PNA-Rezeptoren" nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß die meisten bei Lektinkonzentrationen zwischen 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$

besetzt waren. In einem weiten Konzentrationsbereich von 75 bis 500 µg/ml wurden nahezu alle Zellen angefärbt. Die Bindung an die Zellen konnte durch Galaktose verhindert werden (REISNER, 1977).

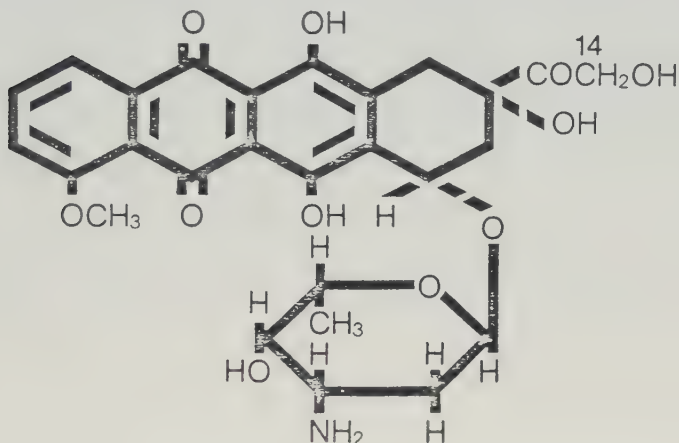
Weitere Untersuchungen ergaben, daß mit steigender Entdifferenzierung der Tumorzellen zunehmend PNA gebunden wird. Bei normalen Zellen Erwachsener werden oftmals die spezifischen Sequenzen maskiert. Diese Maskierung konnte mit Neuraminidase aufgehoben werden. PNA ist in der Lage, T-Antigen (Thomas Friedreich Antigen) zu erkennen (REISNER, 1977).

An Kaninchen-Nieren wurden Bindungsversuche durchgeführt. Diese ergaben eine Bindung des Lektins an der Rinde und im äußeren Mark, allerdings nur an der luminalen Membran. Außerdem fand man Bindungen am dünnen absteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife im inneren Mark (LE HIR, 1982). Bindungsversuche bei Mamma-Carcinomen zeigten eine ausschließliche Bindung an die epithelialen und nicht an die myoepithelialen sowie mesenchymalen Zellen (NEWMAN, 1979).

1.2 Charakterisierung der eingesetzten Zytostatika

1.2.1 Charakterisierung von ADRIAMYCIN (ADRIBLASTIN^R)

ADRIAMYCIN gehört zur Gruppe der zytostatisch wirkenden Antibiotika, ohne jedoch antibakterielle Wirkungen aufzuweisen. Adriamycinhydrochlorid (ADM) ist ein Anthracyclin-derivat, welches aus der Kultur von *Streptomyces peucetius* var. *caesius* isoliert wurde. Es besteht aus einer chromophoren Gruppe (Adriamycinon), die glykosidisch mit einer Aminopyranose (Daunosamin) verbunden ist. Vom chemisch verwandten DAUNORUBICIN^R unterscheidet es sich durch Substitution eines H-Atoms durch eine OH-Gruppe am C-Atom 14 (Produktinformation Farmitalia Carlo Erba GmbH).



(8 S, 10 S)-10-[(3-Amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)-oxy]-8-glycoloyl-5,7,8,9,10,12-hexahydro-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-naphhtacen-5,12-dion-hydrochlorid
(= Doxorubicinhydrochlorid).

Strukturformel ADRIBLASTIN^R

(Produktinformation Farmitalia Carlo Erba GmbH)

1.2.1.1 Wirkungsmechanismus

ADM gelangt schnell in die Zelle und bindet an nukleare Strukturen, besonders an perinukleolares Chromatin. Die molekularen Wechselwirkungen basieren auf Anlagerung (Interkalkation) an die DNS-Doppelhelix. Hierdurch wird die identische DNS-Replikation und RNS-Transkription gehemmt (DI MARCO, 1975).

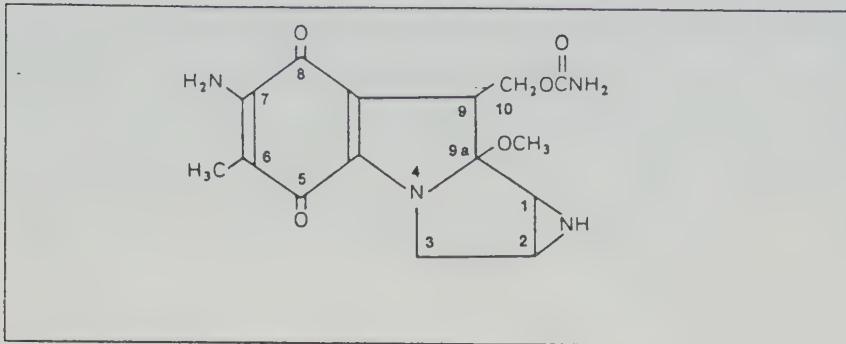
1.2.1.2 Klinische Verwendung

Im klinischen Gebrauch hat sich ADM bei einigen soliden Tumoren sowie bei den Hämoblastosen bewährt (Produktinformation Farmitalia). Es wird beim Blasenkarzinom systemisch oder zur intravesicalen Instillationstherapie eingesetzt. Bei intravesicaler Anwendung konnten praktisch keine systemischen Nebenwirkungen beobachtet werden (EKS-BORG, 1980; ENGELMANN, 1981).

ADM hat sich bei der Therapie des Harnblasenkarzinoms in der Klinik bewährt (ENGELMANN, 1981).

1.2.3 Charakterisierung von MITOMYCIN (MITOMYCIN medac^R)

Das zur Gruppe der alkylierend wirkenden Antibiotika gehörende MITOMYCIN (MMC) wird aus der Fermentation von *Streptomyces caespitosus* gewonnen (Mol.Gew. 334).



MMC-Strukturformel

(Produktinformation medac GmbH)

Als potentiell aktiv werden die Chinon- und Urethangruppe sowie der Aziridin-Ring angenommen. Ein reduzierend wirkendes Enzymsystem aktiviert das schnell intrazellulär aufgenommene MMC zu einem bi- oder trifunktionellen Alkylans. Die DNS-Synthese wird selektiv gehemmt, wobei der Wirkungsmechanismus noch unbekannt ist. Bei der Zellzyklusunspezifischen Wirkung werden die S-G₂ und M-Phase stärker als die G₀- und G₁-Phase beeinflusst. Hierbei ist eine Dosisabhängigkeit zu beobachten (WENNERBERG, 1984; KIMBER, 1978).

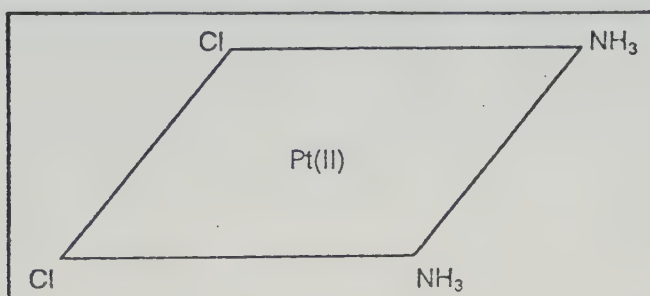
MMC wird bei einer großen Anzahl von Tumoren angewendet. Es hat sich dabei besonders bei der intravesicalen Rezidivprophylaxe des Blasenkarzinoms und der systemischen Anwendung bei fortgeschrittenen Blasentumoren bewährt.

Nach allgemeiner Tumorresektion mit der TUR-Technik treten innerhalb von fünf Jahren 40 bis 70 % Rezidivtumoren auf. Die mit MMC nachbehandelten Patienten waren in 70 bis 90 % rezidivfrei (HULAND, 1983; BAUER, 1984). Bei intrakavitärer Applikation werden keine systemischen Nebenwirkungen beobachtet (FLÜCHTER, 1983).

1.2.4 Charakterisierung von CISPLATIN (PLATINEX^R)

Bei Elektrolyseversuchen wurde CISPLATIN 1965 von ROSENBERG entdeckt (ROSENBERG, 1965). Es wird heute bei der Behandlung zahlreicher Tumoren eingesetzt.

Chemisch handelt es sich um Cis-Diammindichlorplatin (II). Diese Verbindung stellt einen planaren Schwermetallkomplex mit zweiwertigem Platin als Zentralatom und einem Mol.Gew. von 300 Dalton dar (PREUSSER, 1985).



Strukturformel CISPLATIN (ACHTERRAT, 1979)

Die Wirkungsweise von CISPLATIN ist zellzyklusunspezifisch, und es finden sich auch zytozide Wirkungen bei ruhenden Zellen (DREWINKO, 1981). Elektrophile Aquokomplexe, die intrazellulär entstehen, wirken auf die nukleophilen Zentren der DNS und anderer Moleküle ein (ZWELLING, 1982). Molekular zeigen sich ähnliche Effekte wie bei den bifunktionellen Alkylantien. Ausschlaggebend für die Wirkung ist die Quervernetzung der RNS durch Platinierung. Hierdurch wird die DNS- und RNS-Synthese gehemmt (DUCORE, 1982).

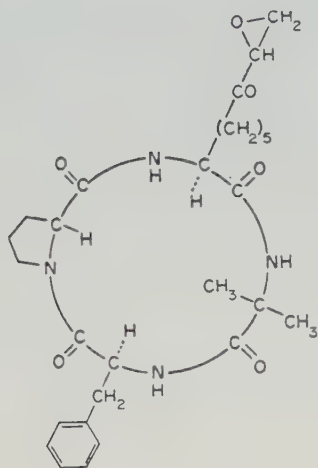
Für die Pharmakokinetik wird ein Zwei- oder Drei-Kammer-Modell angenommen. CISPLATIN weist eine schnelle Proteinbindung auf. Zwei bis fünf Stunden nach Gabe sind bereits über 90 % gebunden. Renal werden bei normaler Nierenfunktion in den ersten 24 Stunden 14 bis 25 % eliminiert. Nach 120 Stunden kann eine 20- bis 65%ige Ausscheidung im Urin bestimmt werden (PENTA, 1982).

Der restliche Anteil der Platinmoleküle kann noch nach mehreren Monaten im Gewebe nachgewiesen werden (ACHTER-RATH, 1979).

Bei der Therapie des metastastasierenden Blasenkarzinoms konnten unter einer Kombinationstherapie mit CISPLATIN 40 bis 60 % Remissionen für vier bis neun Monate beobachtet werden. Bei vergleichenden Studien konnten zwischen Monotherapie und Kombinationstherapie keine Unterschiede in der Remissionsrate und medianer Überlebenszeit verzeichnet werden (KHANDEKAR, 1983; PREUSSER, 1985).

1.2.5 Charakterisierung von CHLAMYDOCIN

CHLAMYDOCIN wurde 1967 aus Kulturen von *Diheterospora chlamydosporia* isoliert und gereinigt. Es handelt sich um ein zyklisches Tetrapeptid, welches aus Prolin, Phenylalalin, -amino-isobutyrat und 2-amino-8-oxo-9,10-epoxi-kaprinat besteht (CLOSSE, 1974).



Strukturformel CHLAMYDOCIN (STÄHELIN, 1974)

Es fällt die hohe Zytotoxizität bei geringer systemischer Toxizität am Tier auf (STÄHELIN, 1974). Dabei zeigte sich, daß höhere Dosen gegenüber niedrigeren oftmals keine besseren zytotoxischen Wirkungen aufweisen. Der biochemische Angriffspunkt ist bisher noch nicht letztlich aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, daß die Epoxigruppe der Amino-Kaprinsäure - ähnlich wie bei den Alkylantien - für die zytostatische Wirkung verantwortlich ist. Andererseits ist die isolierte Epoxycarbonyl-Seitenkette ohne Verbindung zum Tetrapeptidring biologisch nicht aktiv (STÄHELIN, 1974).

Es zeigte sich, daß CHLAMYDOCIN bei langsamer Infusion eine viel höhere Zytotoxizität aufweist als bei der Applikation als Bolus oder bei schneller Infusion. Es muß daher angenommen werden, daß ein langer Kontakt zwischen Zellen und CHLAMYDOCIN notwendig ist, um gute Effekte zu erzielen (STÄHELIN, 1974).

Bei früheren Versuchen fiel eine Diskrepanz zwischen hoher zytostatischer in-vitro-Aktivität und einer vergleichsweise geringen in-vivo-Aktivität (im Tierversuch) auf (STÄHELIN, 1974). Bei Gabe im Vollblut oder in frischem Rattenserum kommt es zu einer hohen Aktivitätsminderung, bei hitzeinaktiviertem Ratten- oder Pferdeserum hingegen zu einer geringeren Aktivitätsminderung (STÄHELIN, 1974).

Als Ursache dafür kann folgendes angesehen werden: Einerseits ist CHLAMYDOCIN im Blut chemisch instabil, andererseits geht die Inaktivierungskapazität bei Erhitzung über 56 °C verloren (STÄHELIN, 1974).

2 MATERIAL

2.1 Versuch der Etablierung von Blasentumorzelllinien

Bei den durchgeführten Versuchen war es nicht möglich, aus über 40 Blasenkarzinomen länger wachsende Zellkulturen zu etablieren. Folgende Gründe waren hierfür verantwortlich:

1. Extrem lange Mitoseraten der Tumorzellen
2. Meist Verwendung von Tumormaterial, was mit der TUR-Technik gewonnen wurde. Durch Elektroagulation waren die Zellen denaturiert.
3. Primär immer infiziertes Gewebe durch tumorbegleitende Harnwegsinfekte und Probleme bei der sterilen Materialentnahme im OP.
4. Durch die geringe Größe der Tumoren (verglichen mit Nierentumoren) nur sehr wenig Zellen gewinnbar

Dies machte eine Langzeitkultivierung unmöglich.

2.2 Blasentumorzelllinie KK-47

Wir entschlossen uns, die etablierte Blasentumorzelllinie KK-47 zu verwenden.

HISAZUMI charakterisiert die Blasentumorzelllinie KK-47 wie folgt: Die Tumorzellen stammen von einem Patienten mit Blasenkarzinom (Urothelkarzinom Stadium A, Grad 1 hoch differenziert, Blutgruppe A). Die Zellen wurden in Japan (Urologische Klinik Kanazawa-Universität) in Ham F 12 Medium (20 % FCS; Nissui Pharm., Tokyo) kultiviert. Die Zelllinie befand sich in der 130. Passage.

Lichtmikroskopische Eigenschaften:

In der HE-Färbung stellen sich die Zellen folgendermaßen dar: polygonale, pflastersteinartige Zellen. Die Nuclei sind hyperchromatisch und haben klare Nucleoli. Die sternförmigen Zellen weisen ein eosinophiles, überlappendes Zytoplasma auf. In der Mitosephase haben die sich überlappenden etwas kleineren Rundzellen klare, große, runde Nuclei.

Die in der 160. Passage durchgeführte Chromosomenanalyse zeigte eine hyperdiploide Anzahl von 59 Chromosomen und 2 Markerchromosomen mit einem Centromerindex von 20,0 und 28,5. Weitere Untersuchungen ergaben dieselben Tumorzellen, wie sie auch in der Ausgangskultur vorhanden waren. Die Tumorverdoppelungszeit beträgt 23,5 Stunden (HISAZUMI, 1979).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es sich bei dieser Zelllinie um gutes Ausgangsmaterial für Experimente mit malignen Blasentumoren handelt.

2.3 Hypernephroide Nierenzellkarzinome

Bei den oben angegebenen Experimenten wurden Versuche an 15 hypernephroiden Nierenzellkarzinomen und normalen Nierengeweben durchgeführt.

Hierbei wurde aus der nephrektomierten Niere unter sterilen Bedingungen repräsentatives Tumormaterial entnommen und sofort verarbeitet (s. Methode).

Aus folgenden Gründen wurde eine Soforttestung durchgeführt:

1. Möglichst kurze Zeit zwischen Testbeginn und Erhalt der Ergebnisse
2. Geringeres Infektionsrisiko als in der Langzeitkultur

3. Testung repräsentativer Tumorzellen, die durch Kultivierung keinen Selektionsmechanismen unterlagen
4. Testung ohne zu großen technischen Aufwand möglich
5. Routinemäßige Anwendung möglich
6. Keine zu hohen Kosten

Durch die kombinierte mechanische und enzymatische Aufarbeitung des Tumorgewebes konnte die Kontamination mit Fibroblasten vermieden werden. Elektromikroskopische Untersuchungen bestätigen dies (BOLLEN, 1985).

2.4 Verwendete Materialien, Geräte und Medien

2.4.1 Sterile Kunststoffeinmalmaterialien

Kulturflaschen, 150 cm ² (650 ml)	Costar, Cambridge (USA)
Bakteriologische Petrischalen, 96 mm Ø	Greiner, Nürtingen
Tissue culture cluster, 24 wells à 16 mm Ø	Costar, Cambridge (USA)
Pipetten: 1 ml, 5 ml, 10 ml	Miles Lab., Naperville
Tissue culture cluster, 96 wells, 7 mm Ø	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter: 0,22 µm, Miles-GS	Millipor, Molsheim
Zentrifugenröhrchen:	
50 ml, mit Schraubdeckel (Nunc)	Intermed, Wiesbaden
Falcon, 17x100 mm, mit Druckdeckel	Bacton & Bikkenson (USA)
Falcon, 12x 75 mm, mit Druckdeckel	Bacton & Bikkenson (USA)
Eppendorfpipetten:	
5 µl, 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
12-Kanal-Pipette Finpipet ^R	
Multipette 50 µl	Eppendorf, Hamburg
Szintillationsfläschchen	
mit Schraubverschluß	Müller ratiolab, Dreieich

2.4.2 Glaswaren

Erlenmeyerkolben, 150 ml mit Magnetrührer, mit Aluminiumfolie zur Autoklavierung abgedeckt

Glasflaschen mit Schraubdeckel, 100 ml, 500 ml, mit Aluminiumfolie zur Autoklavierung abgedeckt

Neubauerzählkammer

2.4.3 Filterpapier und Szintillationsflüssigkeit

Whatman Zellulose Filterpapier,

2,4 cm Ø, Dicke 3 mm,

Nr. 1030024

Quickszint 50

Whatman Ltd., England

Zinsser Analyt.

2.4.4 Verwendete Zytostatika, Lektine, Zucker, Nährmedien sowie andere Chemikalien und Hilfsstoffe

2.4.4.1 Zytostatika

DOXORUBICIN-HCL (ADRIBLASTIN ^R)	Montedison Pharma, Freiburg
MITOMYCIN (MITOMYCIN medac ^R)	MEDAC GmbH, Hamburg
CISPLATIN (PLATINEX ^R)	Bristol-Meyers, Neu-Isenburg
VINDESIN-SULFAT (ELDISINE ^R)	Elly Lilly, Gießen
CHLAMYDOCIN	Sandoz AG, Basel

2.4.4.2 Lektine

Concanavalin A (CON A)	MEDAC GmbH, Hamburg
Wheat germ (WGA)	MEDAC GmbH, Hamburg
Ricinus communis (RCA)	MEDAC GmbH, Hamburg
Peanut Agglutinin (PNA)	MEDAC GmbH, Hamburg
Soybean (SBA)	MEDAC GmbH, Hamburg
Abrin (APA)	MEDAC GmbH, Hamburg

2.4.4.3 Zucker

D-Galaktose	MEDAC GmbH, Hamburg
D-Mannose	MEDAC GmbH, Hamburg
N-Acetyl-D-Glucosamin	MEDAC GmbH, Hamburg

Die Zytostatika und Lektine wurden mit komplettem Medium steril angesetzt, bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad erwärmt. Die Lektin-Peroxidasen wurden mit PBS angesetzt. Die Zucker und das Zytostatikum CHLAMYDOCIN wurden steril mit Medium angesetzt, bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad erwärmt.

2.4.4.4 Radioaktivität

(6-H ³) Thymidin, Code TRK 61	
(1,0 mCi/ml)	Amersham Int., Amersham (U.K.)
(5,6-H ³) Uridin, Code TRK 410	
(1,0 mCi/ml)	Amersham Int., Amersham (U.K.)

Die Aktivität wurde unter sterilen Bedingungen mit komplettem Medium verdünnt und bei -20 °C gelagert. Bei Gebrauch wurde sie im Wasserbad erwärmt.

2.4.4.5 Vitalitätsfärbung

Trypanblau,	
0,5 % in physiol. NaCl	Biochrom, Berlin

2.5 Nährmedium

DMEM Trockenmedium ohne NaHCO_3 ,

mit Glutamin

Biochrom, Berlin

Fetales Kälberserum, getestet

auf Mycoplasmen,

bakt. L-Formen,

Viruskontamination

100,0 ml

Biochrom, Berlin

L-Glutamin, 200 mMol

10,0 ml

Biochrom, Berlin

Na-Pyruvat, 100 mMol

10,0 ml

Böhringer, Mannheim

Nicht essentielle

Aminosäure (100fach)

10,0 ml

Biochrom, Berlin

Na-Bicarbonat, 7,5 %

29,3 ml

Biochrom, Berlin

Penicillin-Streptomycin

10 000 E/10 000 µg/ml

10,0 ml

Biochrom, Berlin

Amphotericin B, 250 µg/ml

10,0 ml

Biochrom, Berlin

Das steril angesetzte Medium wurde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Pufferlösung PBS-Trockensubstanz-

Gemisch ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Biochrom, Berlin

Ampuwa (steriles pyrogenfreies Aqua

ad injectabile)

Fresenius, Bad Homburg

Enzym-Dissoziationslösung:

Trypsin (1:250), 2,5 % in PBS

Biochrom, Berlin

EDTA (Versen), 1,0 % in PBS

Biochrom, Berlin

Zur Zellgewinnung aus Gewebe:

0,5 % Trypsin, 0,02 % EDTA, PBS

Zur Ablösung der Zellen aus der Kultur-

flasche bzw. aus den 96-Loch-Platten:

0,25 % Trypsin, 0,01 % EDTA, PBS

Das steril angesetzte Trypsin wurde bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad erwärmt.

Materialien zur Peroxidase-Färbung:

Formaldehyd 10 %	Apothekenabfüllung
Methanol-Wasserstoffsuperoxyd-Lsg. (200 ml Methanol + 2ml H^2O^2)	Apothekenabfüllung
DAB-Lösung (1 g/100 ml	Sigma, St. Louis (USA)
Hämalaun	Merck, Darmstadt

2.6 Verwendete Geräte

Sterilbank, laminar Flow	SLEE, Mainz
Brutschrank, CO_2 -begast	Haereus, Hanau
Laborzentrifuge	Haereus-Christ, Hanau
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Magnetrührgerät Rühromag	IKA, Stauffen (Brsg.)
Pipetiergerät Pipetus	Technomara, Zürich
SL 30 liquid scintillations spectrom.	Fa. Interechnique
Zellharvester	Flow-Laboratories, (U.K.)
McIwain electric tissue Shopper	Mickle Comp., Gomshall (U.K.)
Auflichtmikroskop Ortholux (Optiken 2, 5, 10, 25, 40, 100, 400)	Leitz, Wetzlar
Mikrophotoapparat Ortholux	Leitz, Wetzlar

3 METHODE

3.1 Testung mit Blasentumorzelllinie KK-47

3.1.1 Gewinnung der Zellen aus der Zellkultur

Nach Abgießen des Mediumüberstandes wurden die Zellen mit 0,2 % Trypsin gespült. Zur Ablösung der Zellen aus der Zellkulturflasche wurde Trypsin für ca. eine Minute hinzugegeben. Der Trypsinüberstand wurde verworfen; es wurde kurz auf das Ablösen der Zellen gewartet. Nun wurde die Kulturflasche mit Medium ausgespült und somit die Tumorzellen gewonnen. Die Zell-/Mediumsuspension wurde bei 800 rpm zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellsediment mit komplettem Medium resuspendiert. Hierauf wurde die Zellzählung, wie oben beschrieben, durchgeführt.

3.1.2 Weiterer Versuchsablauf.

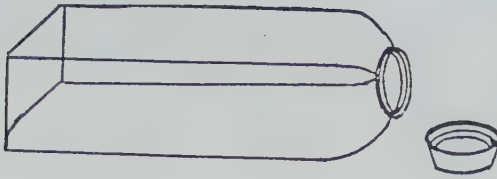
Pro well wurden 1×10^4 Zellen, gelöst in 100 μ l Medium, pipettiert. Die Kultivierung erfolgte, wie bereits bei den Nierentumoren beschrieben. Es wurden auch hier Kinetikversuche durchgeführt, die eine optimale Versuchsdauer von 23 bis 24 Stunden nach Zugabe der Aktivität ergaben (s. Abb. 1). Es wurden 600 000 cpm Aktivität/well hinzugegeben.

3.1.3 Beendigung des Versuchs

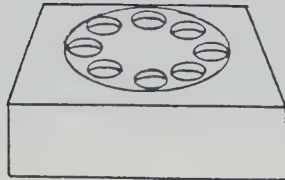
- Absaugen des Überstandes mit 12-Kanal-Pipette
- Zweimal Waschen der Zellen (12-Kanal-Pipette) mit PBS/BSA
- Inkubation der Zellen mit Trypsin 0,2 % für fünf Minuten zur Ablösung der Zellen
- Abpipettieren auf Whatman-Filterpapier
- Trocknung der Filter an der Luft in Alufolie
- Zählen der mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit überschichteten Filter im β -Counter (10 Minuten pro Probe).

Zur Verdeutlichung soll der Versuchsablauf im folgenden Flußdiagramm nochmals schematisch dargestellt werden.

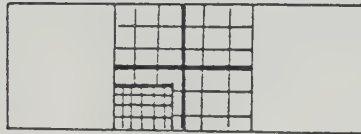
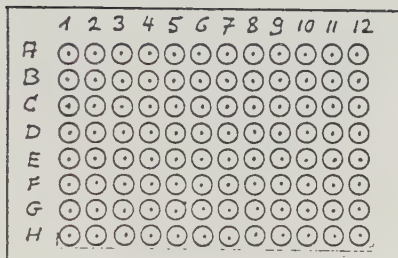
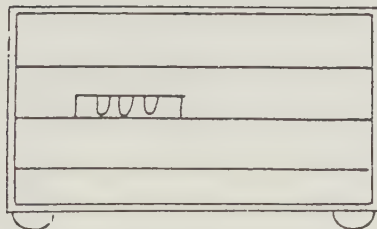
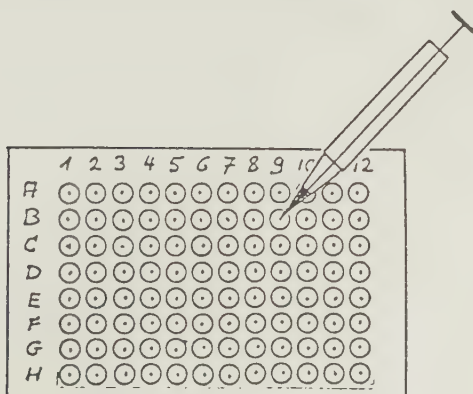
Abbildung 1 Flußdiagramm der Versuche mit KK-47-Zellen

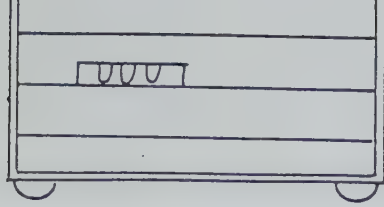


Zellkultur

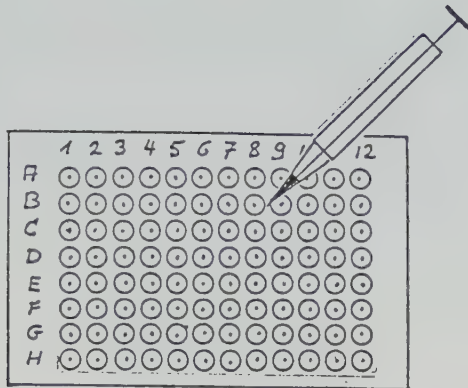


Zentrifugieren

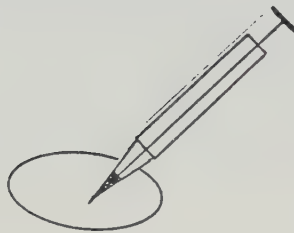
Zellzählung in
Neubauer-ZählkammerPipettieren der Einzel-
zellsuspension in
96-Loch-PlatteVorinkubation der Zellen
im Brutschrank über NachtZugabe der Aktivität und
der eingesetzten Stoffe



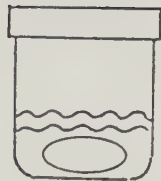
Inkubation im Brutschrank



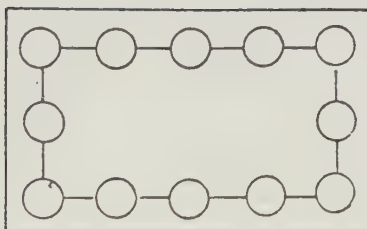
Auswaschen der Aktivität
und Ablösen der Zellen
mit Trypsin



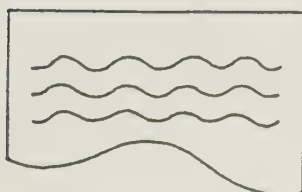
Pipettieren der Zellen
auf Filterpapier



Überschichten des Filter-
papiers mit Szintilla-
tionsflüssigkeit



Auswertung im β -Counter



Ausdruck der Ergebnisse

Mit dieser Versuchsanordnung wurden folgende Stoffe getestet:

Arzneimittel: Konzentration im well ($\mu\text{g/ml}$)

ADRIBLASTIN ^R	33,3; 3,3; 0,83; 0,33; 0,083; $8,3 \times 10^{-3}$
RCA II	83,3; 41,6; 8,30; 4,16; 0,830; 0,416; 0,083
CON A	333,3; 166,6; 83,30; 16,60; 8,330; 1,660; 0,83; 0,160
WGA	166,6; 83,3; 16,60; 8,33; 1,660; 0,830; 0,16; 0,083
SBA	333,3; 166,6; 83,30; 16,60; 8,300; 1,660; 0,83; 0,166
PNA	333,3; 166,6; 83,30; 16,60; 8,300; 1,660; 0,83; 0,166
APA	166,6; 83,3; 16,60; 8,30; 1,600; 0,830; 0,16; 0,083
CHLAMYDOCIN	$3,3 \times 10^{-4}$ g/ml; $3,3 \times 10^{-7}$ g/ml; $3,3 \times 10^{-10}$ g/ml

3.1.4 Hemmungsversuche mit Zuckern bei Lektinen

In der Literatur wird die Möglichkeit der Hemmung der Arzneimittelwirkungen der Lektine durch spezifische Zucker beschrieben (SHARON, 1972; WALKER-NASIR, 1981). Daher wurden Hemmungsversuche mit Zuckern durchgeführt.

Hierzu war es notwendig, in Vorversuchen die Wirkungen der Zucker allein auf die Zellen zu studieren.

Es wurden folgende Zuckerkonzentrationen in der Zellsuspension ausgewählt:

Zucker	Konzentration (Mol/l)
Mannose	1,0; 0,50; 0,33; 0,1
Galaktose	1,0; 0,50; 0,33; 0,1
NAc-Glc	0,4; 0,33; 0,20; 0,1; 0,03

Aufgrund der Einflüsse der Zucker bezüglich der Kontrollgruppe (s. Ergebnisteil) wurden folgende Zuckerkonzentrationen für die weiteren Versuche herangezogen:

Mannose: 0,10; 0,2 mol
 Galaktose: 0,10; 0,2 mol
 NAc-Glc : 0,03; 0,1; 0,2 mol

Aus der Literatur wurden folgende Spezifitäten der Zucker gegenüber den Lektinen entnommen (SHARON u.a., 1972):

Galaktose: SBA, APA, RCA II, PNA
 Mannose: CON A
 NAc-Glc : WGA

Die Zucker wurden zu den am meisten inhibierenden Lektinkonzentrationen hinzugegeben (s. Ergebnisteil).

3.2 Testung von Nierenzellkarzinomen

3.2.1 Zellgewinnung aus Tumorgewebe

Vom Operationssaal wurde die entfernte Niere unter sterilen Bedingungen sofort in das Labor transportiert. Aus dem Tumor wurde ein repräsentatives Stück unter der Sterilbank entfernt und mit Skalpell in einer Petrischale in 1 bis 2 mm kleine Gewebestückchen zerteilt. In einem sterilen Erlmeyer-Kolben wurden die Tumorzellen mit 0,5 % Trypsin durch 10minütiges Rühren mit einem Magnetrührer enzymatisch gewonnen. Dieser Vorgang wurde bei ungenügender Zelllösung wiederholt. Der Überstand wurde mit gleicher Menge kompletten DMEM-Mediums gemischt, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellen wurden 10 Minuten mit 800 rpm in einem sterilen Plastikzentrifugierröhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nochmals mit komplettem Medium resuspendiert und zentrifugiert, um sie zu waschen. Normale Nierengewebszellen und Tumorzellen wurden in gleicher Weise gewonnen.

3.2.2 Zellzählung

Ein Tropfen Zellsuspension wurde mit einem Tropfen Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Hier wurde die Zellzählung vorgenommen und durch die Färbung mit Trypanblau der Vitalitätszustand der Zellen geprüft. Durch Verdünnung mit komplettem Medium wurde die Endsuspension hergestellt. 100 μ l dieser Suspension wurden in jedes well pipettiert (10^5 Zellen/well).

3.2.3 Kultivierung und Testung

Zur Erholung von der Zellpräparation wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂, 95 % O₂, 100 % H₂O-Dampf). Für die Kinetikversuche wurden dann 50 μ l H³-Thymidin-/Uridin-Mediumlösung pro well hinzupipettiert (2,5 yCi). Um eine Kinetikkurve zu erhalten, wurden nun je 6 well (Thymidin/Uridin markiert) in verschiedenen Zeitabständen geharvestet.

3.2.4 Beendigung des Versuchs

Die Zellen wurden mit einem Zellharvester (Flow-Laboratories, England) auf Filterpapiere gesaugt. Vorher spülte die Maschine jedes well mit Kochsalzlösung, um die nichtinkorporierte Aktivität auszuspülen. Die Filterpapiere (Whatman filters, Balston Ltd., England) wurden nach Trocknung und Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im β -Counter gezählt. Aus den Ergebnissen wurde eine Kinetikkurve erstellt (s. Ergebnisteil). Bei der Analyse der Kinetikkurve stellte sich heraus, daß die günstigste Versuchsdauer bei ca. 72 Stunden liegt. Außerdem können sich bei längeren Bebrütungszeiten die Kultivierungs- und Wachstumsbedingungen der Zellen verändern.

3.2.5 Testung von Zytostatika und Lektinen

Die Versuchsanordnung wurde so belassen, wie oben beschrieben. Jedoch wurden nach der Nachtinkubation 50 µl des Mediumüberstandes pro well abpipettiert und 50 µl der Zytostatika- bzw. Lektinlösung hinzugefügt. Die 12 wells pro Reihe wurden folgendermaßen aufgeteilt:

well 1 bis 3 Kontrolle (nur Mediumzugabe)
 well 4 bis 6 geringste AM-Konzentration
 well 7 bis 9 mittlere AM-Konzentration
 well 10 bis 12 höchste AM-Konzentration

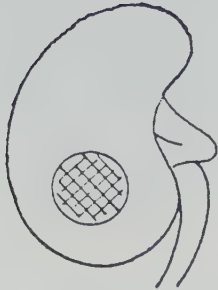
Folgende Arzneimittel und Konzentrationen wurden verwendet:

Arzneimittel	Konzentration in der Zellsuspension (µg/ml)		
PLATINEX	0,01; 0,002; 0,001		
ELDESINE	40;	4;	0,4
ADRIBLASTIN	40;	4;	0,4
MITOMYCIN	0,04; 0,002; 0,0004		
RCA II	10;	1;	0,1
CON A	20;	2;	0,2
WGA	20;	2;	0,2

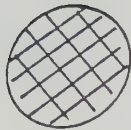
Die verwendeten Zytostatikakonzentrationen orientierten sich an therapeutisch verwendeten Plasmakonzentrationen.

Zur Verdeutlichung soll der Versuchsablauf im folgenden Flußdiagramm nochmals schematisch dargestellt werden.

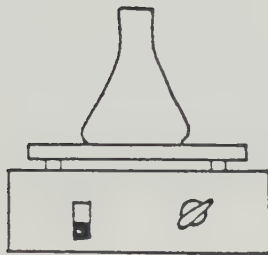
Abbildung 2 Flußdiagramm der Versuche mit hypernephroiden Nierenkarzinomen



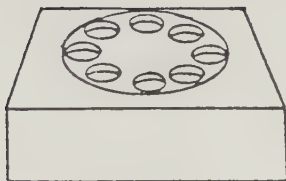
Nephrektomie



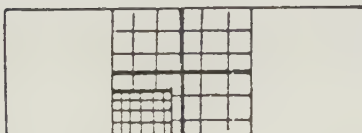
mechanische Zerkleinerung
des Gewebestückes



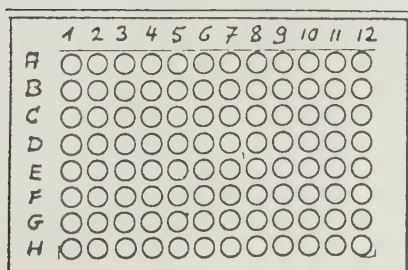
enzymatische Zellgewinnung



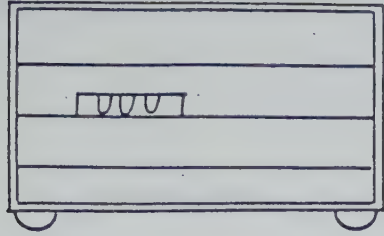
Zentrifugieren



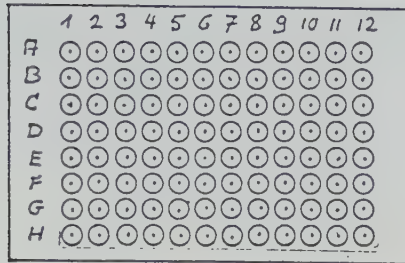
Zellzählung in Neubauer-
Zählkammer



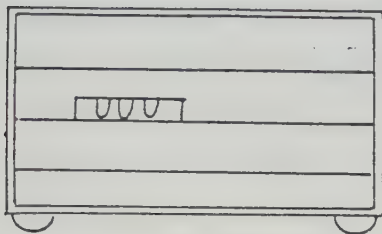
Pipettieren der Einzelzell-
suspension in 96-Loch-
Platte



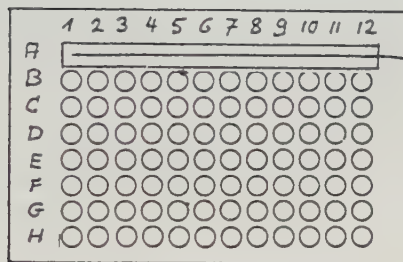
Vorinkubation der Zellen
im Brutschrank



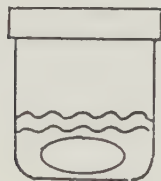
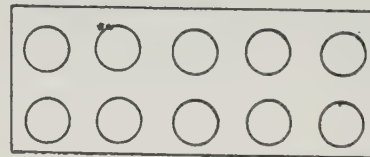
Zugabe der Aktivität und
der eingesetzten Stoffe



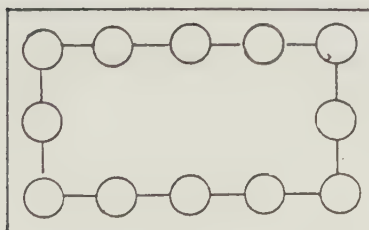
Inkubation im Brutkasten



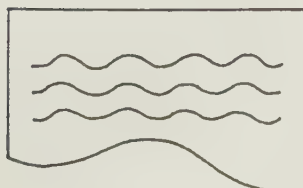
Harvesten auf Filterpapier
mit Zellharvester



Überschichten des Filter-
papiers mit Szintillations-
flüssigkeit



Auswertung im β -Counter



Ausdruck der Ergebnisse

3.3 Mikroskopische Untersuchungen der eingesetzten Zellen

Bei allen Versuchen wurden folgende Routineuntersuchungen durchgeführt:

Beurteilung der Zellen vor der Zugabe von Zytostatika durch ein Plattenmikroskop, um Infektionen auszuschließen und die Bildung von Zellhaufen in einzelnen wells zu erkennen.

Diese wells wurden gekennzeichnet und bei der Auswertung berücksichtigt.

Vor Abbruch des Versuchs wurden die Zellen nochmals mikroskopisch beurteilt, um wiederum Infektionen auszuschließen und gegebenenfalls Zellveränderungen festhalten zu können.

Nach der Harvestung der Zellen wurden die wells letztmalig mikroskopisch betrachtet, um sicherzustellen, daß alle Zellen geharvestet wurden.

Jede zu untersuchende Substanz wurde pro Versuch in drei wells gleichzeitig getestet. Jeder Versuch wurde zweimal durchgeführt (KK-47).

4 ERGEBNISSE

4.1 Kinetikversuche

4.1.1 Kinetikversuche mit KK-47-Zellen

Um für die Versuche mit Lektinen bzw. Zytostatika optimale Versuchsbedingungen zu erhalten, wurde zuerst die Zellkinetik beobachtet. Dabei wurden die Einbauraten über die Zeit aufgetragen. Hierbei zeigte sich, daß relativ kontinuierlich über 23 Stunden Thymidin und Uridin in die Zellen eingebaut wurden. Danach fiel die DNS-Einbaurrate (Thymidin) ab, die RNS-Einbaurrate (Uridin) stieg an (s. Abb. 3a).

Nach 36 Stunden erreicht der Uridin-Einbau ein Plateau, während der Thymidin-Einbau weiter zurückging.

Diese Ergebnisse zeigten eine optimale Versuchsdauer von 23 bis 24 Stunden an.

4.1.2 Kinetikversuche mit hypernephroiden Nierenkarzinomzellen

Wie auch bei den KK-47-Zellen wurden die Einbauraten über einen Zeitraum gemessen und aufgetragen. Dabei zeigte sich, daß ein relativ kontinuierlicher Einbau über ca. 80 Stunden vorlag. Danach fielen die Thymidin- und Uridineinbauraten ab.

Die beste Versuchsdauer lag bei ca. 72 Stunden, längere Versuchszeiten ergaben größere versuchstechnische Schwierigkeiten (s. Abb. 3b).

Abbildung 3a

Zellkinetik von KK-47-Zellen

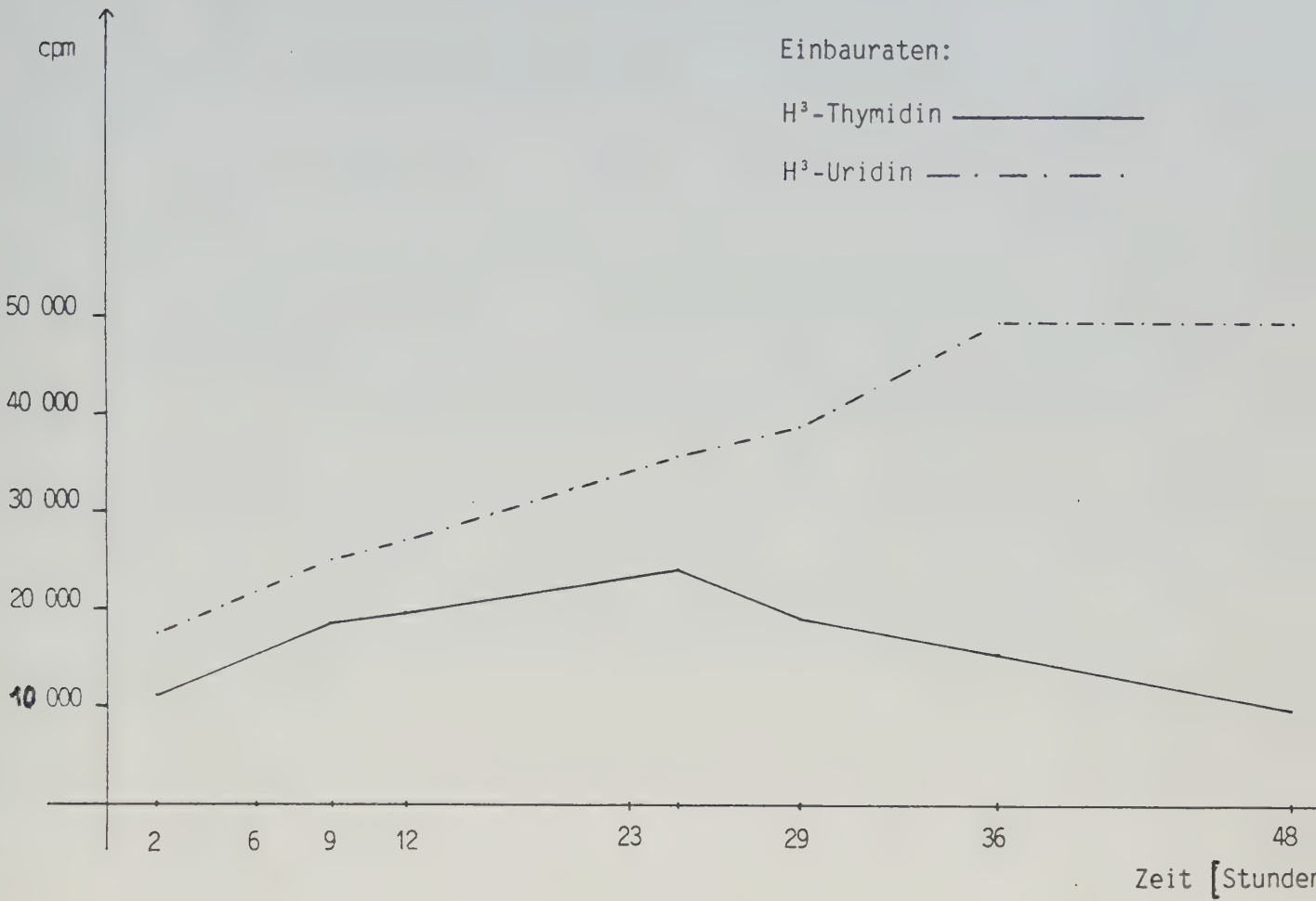
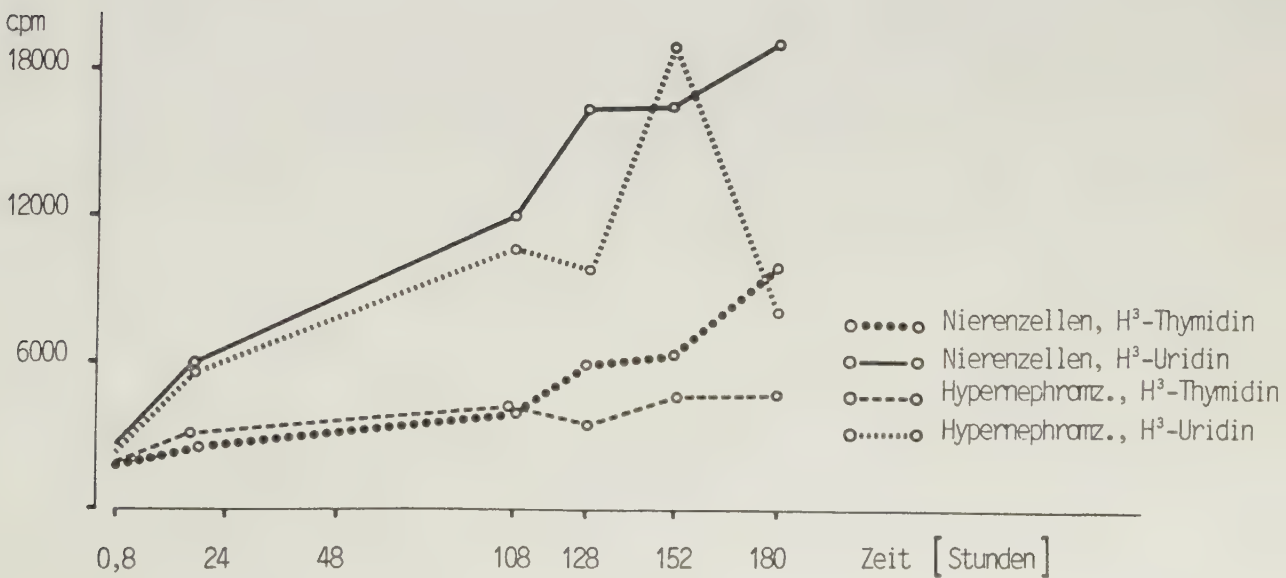


Abbildung 3b

Zellkinetik der Hypernephrom und Nierenzellen des Patienten 485



4.2 Einbaustudien an KK-47-Zellen

4.2.1 Einbaustudien an KK-47-Zellen unter dem Einfluß von Lektinen

4.2.1.1 RCA II

RCA II erreichte schon bei einer Konzentration von 0,083 µg/ml im well eine Thymidineinbauhemmung von 67 %, die bei 4,16 µg/ml auf 77 % anstieg. Bei höheren Konzentrationen verminderte sich die Inhibition geringfügig (s. Abb. 4).

Auch der Uridineinbau wurde schon bei einer Konzentration von 0,083 µg/ml um 59 % vermindert. Bei höheren Konzentrationen wurde ein Inhibitionsniveau von 70 % erreicht, was aber durch Dosissteigerung nicht mehr zu verbessern war (s. Abb. 5).

4.2.1.2 WGA

WGA zeigte bei einer Konzentration von 83,3 µg/ml im well eine Verminderung der Thymidinsynthese von 40 %. Man sah einen relativ kontinuierlichen Abfall bis zu diesem Wert (s. Abb. 6).

Die Uridineinbaurrate wurde nach einer 15%igen Steigerung bei einer Konzentration von 0,083 µg/ml im well auf 50 % des Kontrollwertes gesenkt. Dabei wurde der stärkste Effekt bei einer Konzentration von 83,3 µg/ml im well erreicht. Danach stellte sich ein Plateau ein (s. Abb. 7).

4.2.1.3 CON A

Der Thymidineinbau bei CON A wurde bei einer Dosierung von 16,6 µg/ml um knapp 40 % gesenkt. Bis zu einer Konzentration von 83,3 µg/ml blieb dieses Niveau erhalten.

Bei einer höheren Konzentration wurde der inhibierende Effekt dann wieder geringer. Eine Konzentration von 0,16 µg/ml zeigte einen geringen Anstieg (s. Abb. 6).

Die Uridinsynthese wurde bei ähnlichem Kurvenverlauf um 55 % vermindert. Die Stimulierung bei 0,16 µg/ml im well erreichte hier jedoch knapp 40 % (s. Abb. 7).

4.2.1.4 APA

APA hatte auf den Thymidineinbau einen hemmenden Effekt von 60 %, der bei einer Konzentration von 166,6 µg/ml im well erreicht wurde (s. Abb. 4).

Die Uridinsynthese wurde wie die Thymidinsynthese bei der oben angegebenen Konzentration am stärksten gehemmt, jedoch um 66 % (s. Abb. 5 und 48).

4.2.1.5 PNA

Dieses Lektin zeigte ein den anderen Lektinen gegenüber konträres Verhalten. Ab einer Konzentration von 16,6 µg/ml im well wurde der Thymidineinbau gesteigert. Er wurde bei 333,3 µg/ml im well um knapp 140 % gesteigert (s. Abb. 6).

Die Uridinsynthese wurde bei 16,6 µg/ml um 38 % erhöht, um bei höheren Konzentrationen dann aber wieder auf Normalwerte abzusinken (s. Abb. 7).

4.2.1.6 SBA

Bei SBA fanden sich weder im Thymidin- noch im Uridineinbau Auswirkungen. Im Lektin-Peroxidase-Färbeversuch war bei diesem Lektin auch keine Bindung an die Zellen zu beobachten (s. Abb. 4 und 5).

4.2.2 Hemmungsversuche mit Zuckern bei Lektinen

4.2.2.1 Vorversuch

Bei der Testung der alleinigen Wirkung der Zucker auf den Thymidin- bzw. Uridineinbau in die Zellen wurden für Mannose und Galaktose folgende Konzentrationen verwandt: 0,1, 0,33, 0,5 und 1 mol. Für NAc-Glc 0,03, 0,1, 0,2 und 0,4 mol.

Galaktose und Mannose zeigten ein analoges Verhalten. Bei 1-molaren-Lösungen im well wurde die Thymidinsynthese stark vermindert. Bei schrittweiser Verdünnung der Lösungen bis 0,1 mol zeigte sich eine Anpassung an die Kontrollwerte (s. Abb. 8),

Der Uridineinbau verlief analog (s. Abb. 9).

Da NAc-Glc ein zweiwertiger Zucker ist, wurden die oben angegebenen anderen Konzentrationen gewählt.

Im Thymidineinbau zeigte sich bei einer Zuckerkonzentration von 0,03 mol eine 15%ige, bei 0,1 mol eine 100%ige und bei 0,2 mol eine 25%ige Stimulierung. 0,4-mol-Zuckerlösung führte zu einer starken Inhibition (s. Abb. 8).

Der Uridineinbau wurde um 25 %, 63 % und 22 % stimuliert (s. Abb. 9).

Aufgrund der oben angegebenen Ergebnisse wurden 0,1- und 0,2-mol-Mannose und -Galaktose verwendet. Für NAc-Glc wurden 0,03-, 0,1- und 0,2-molare-Lösungen für die weiteren Versuche ausgewählt.

4.2.2.2 Hemmung von RCA II mit Galaktose

0,1-mol-Galaktose war in der Lage, die Wirkung von RCA II auf Thymidin auf 50 % (statt vorher 75 %), jedoch nicht vollständig zu vermindern (s. Abb. 12).

Auf die Uridinsynthese jedoch hatte die Zugabe von Galaktose zu RCA II keinen Einfluß (s. Abb. 13).

Die Zugabe von 0,2-mol-Galaktose zeigte sowohl auf Thymidin als auch auf Uridin kaum eine Wirkung.

4.2.2.3 Hemmung von WGA mit NAc-Glc

NAc-Glc hob nicht nur die inhibitorischen Einflüsse von WGA auf den Thymidineinbau auf, sondern es stimulierte noch die Thymidinsynthese. 0,1-molare-Zuckerlösung erzeugte eine Stimulation von 70 %, 0,2-molare-Lösung von 29 %, 0,03-molare-Lösungen erreichten nahezu den Kontrollwert (s. Abb. 14).

Auf die Uridinsynthese wirkte sich NAc-Glc in ähnlicher Weise aus. Hier stimulierte jedoch die 0,2-molare-Lösung um 31 %, während die 0,1-molare-Lösung die Synthese lediglich um 18 % über die Kontrollwerte steigerte (s. Abb. 15).

4.2.2.4 Hemmung von CON A mit Mannose

Die Wirkung von CON A auf den Thymidineinbau ließ sich mit Mannose hemmen. 0,1-mol-Mannose vermochte den inhibierenden Effekt aufzuheben, mit 0,2-molarer-Lösung erreichte man die Kontrollausgangswerte nur annäherungsweise (s. Abb. 10).

Auf den Uridineinbau hatte Mannose vergleichbare Wirkungen (s. Abb. 11).

4.2.2.5 Hemmung von APA mit Galaktose

Galaktose übte sowohl auf die Senkung des Thymidin- als auch des Uridineinbaus keine hemmende Wirkung aus (s. Abb. 12 und 13).

4.2.2.6 Hemmung von PNA mit Galaktose

Die stimulatorischen Wirkungen auf die Thymidinsynthese konnten mit 0,2-mol-Galaktose um ca. 20 % vermindert werden (s. Abb. 16).

Die durch PNA fast unbeeinflusste Uridinsynthese wurde durch die Zugabe von 0,2-mol-Galaktose um 30 % gehemmt (s. Abb. 17).

4.2.2.7 Hemmung von SBA mit Galaktose

Das sonst wirkungslose SBA vermochte durch Zugabe von 0,2-mol-Galaktose sowohl die Thymidin- als auch die Uridineinbaureate um 30 % zu vermindern (s. Abb. 16 und 17).

Galaktose 0,2 mol allein hemmte nur um knapp 20 % (s. Abb. 16 und 17).

4.2.3 Einbaustudien an KK-47-Zellen unter dem Einfluß von Zytostatika

4.2.3.1 Versuche mit ADRIBLASTIN^R (ADB)

ADB hemmt den Thymidineinbau kontinuierlich mit ansteigenden Konzentrationen. Bei einer Konzentration von 33,3 µg/ml im well kam es zu einer 92,7%igen Inhibition.

Der Uridineinbau wurde bei gleicher Konzentration um 70 % vermindert (s. Abb. 4 und 5).

4.2.3.2 Versuche mit CHLAMYDOCIN

CHLAMYDOCIN wurde unter Verwendung von 10 bzw. 20 % FCS enthaltendem Medium getestet.

Im Thymidineinbau ergaben sich hierbei Unterschiede im Hemmverhalten. Die 20%ige Lösung zeigte bei der geringsten verwendeten Konzentration von $3,3 \times 10^{-10}$ g/ml einen größeren inhibitorischen Effekt als die 10%ige Lösung. Die Inhibitionskurve flachte sich dann ab und erreichte bei $3,3 \times 10^{-4}$ g/ml eine Verminderung des Thymidineinbaus von 63 %. Die 10%ige Lösung konnte die Thymidinsynthese mit steigender Dosierung kontinuierlich um bis zu 77 % bei $3,3 \times 10^{-4}$ g/ml hemmen (s. Abb. 18).

Bei der Betrachtung des Uridineinbaus war dieses Bild noch ausgeprägter. Die Hemmung bei der höchsten verwendeten Konzentration von $3,3 \times 10^{-4}$ g/ml glich der des Thymidineinbaus (s. Abb. 19).

4.2.3.3 Versuche mit ELDISINE^R, MITOMYCIN^R und PLATINEX^R

Bei der Verwendung der Zytostatika ELDISINE^R, MITOMYCIN^R und PLATINEX^R ergaben sich dosisabhängige Hemmungen der Einbauraten.

PLATINEX^R zeigte jedoch dabei keine hemmenden Effekte im Thymidin- und Uridineinbau (s. Abb. 20 und 21).

Die Dosierungen der eingesetzten Zytostatika entsprachen denen der Hypernephromversuche.

4.3 Einbaustudien an Hypernephromen und normalen Nierenzellen

4.3.1 Einbaustudien unter dem Einfluß von Lektinen

Bei zehn Patienten wurden die Lektine RCA II, WGA und CON A getestet.

RCA II zeigte eine bis zu 60%ige Hemmung des Uridineinbaus (s. Abb. 23, 25 und 28) und eine 40%ige Reduktion der Thymidinsynthese (s. Abb. 22). Die Effekte waren dosisabhängig. Die normalen Nierenzellen wurden von der Inhibition in ähnlicher Weise betroffen (s. Abb. 24, 26, 27 und 29), jedoch wurden die Hypernephromzellen stärker gehemmt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Lektine CON A und WGA zeigte sich in ca. 60 % der Fälle bei niedrigen Konzentrationen von 0,2 µg/ml im well eine Steigerung der Einbauraten um ca. 35 bis 60 % von Thymidin und Uridin. Bei Erhöhung der Lektinkonzentration zeigten sich hemmende Effekte auf die Einbauraten (s. Abb. 28 und 29) sowohl bei hypernephroiden als auch bei normalen Nierenzellen. Bei ca. 30 % der Tumoren wurde eine inhibitorische Wirkung in allen Konzentrationen beobachtet (s. Abb. 22 und 23).

Bei einem Vergleich der drei Lektine stellte sich RCA II als das am stärksten wirksame heraus.

4.3.2 Einbaustudien unter dem Einfluß von Zytostatika

An zehn Tumoren wurden die Zytostatika ADIRBLASTIN^R (ADB), MITOMYCIN^R (MMC), PLATINEX^R und ELDISINE^R getestet. Sechs Tumoren zeigten ein mäßiges Ansprechen auf eines oder zwei der Zytostatika. Dabei war die Wirkung auf den Thymidin- bzw. Uridineinbau nicht identisch.

PLATINEX^R inhibierte den Uridineinbau eines Patienten um 42 % (s. Abb. 31). Bei zwei Patienten wurde der Uridin-uptake um knapp 40 % gemindert.

Für MCC und ELDISINE^R wurden bei zwei Patienten Minderungen der Einbauraten festgestellt (s. Abb. 30 und 33).

Bei der Betrachtung der normalen Nierenzellen fiel auf, daß im allgemeinen keine wesentlichen inhibierenden Effekte zu verzeichnen waren (s. Abb. 35). Bei den Patienten 513 und 561 jedoch wurde das Zellwachstum des normalen Nierengewebes durch die Zytostatika drastisch gehemmt (s. Abb. 34 und 37).

Die Zytostatikaversuche bestätigten die bekannte Resistenz dieser Tumorart gegenüber bisherigen Zytostatika.

Abbildung 4 Einfluß von RCA, APA, SBA und ADRIBLASTIN^R auf den H³-Thymidineinbau von KK-47-Zellen

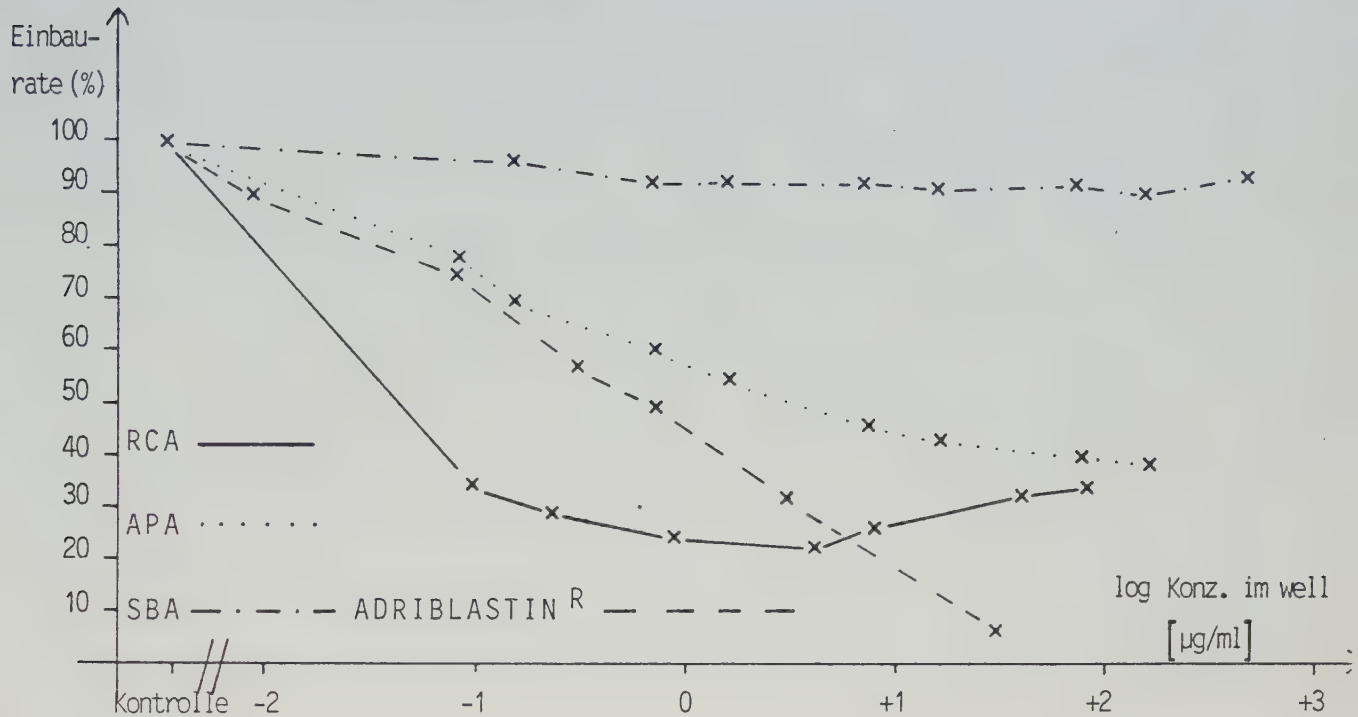


Abbildung 5 Einfluß von RCA, APA, SBA und ADRIBLASTIN^R auf den H³-Uridineinbau von KK-47-Zellen

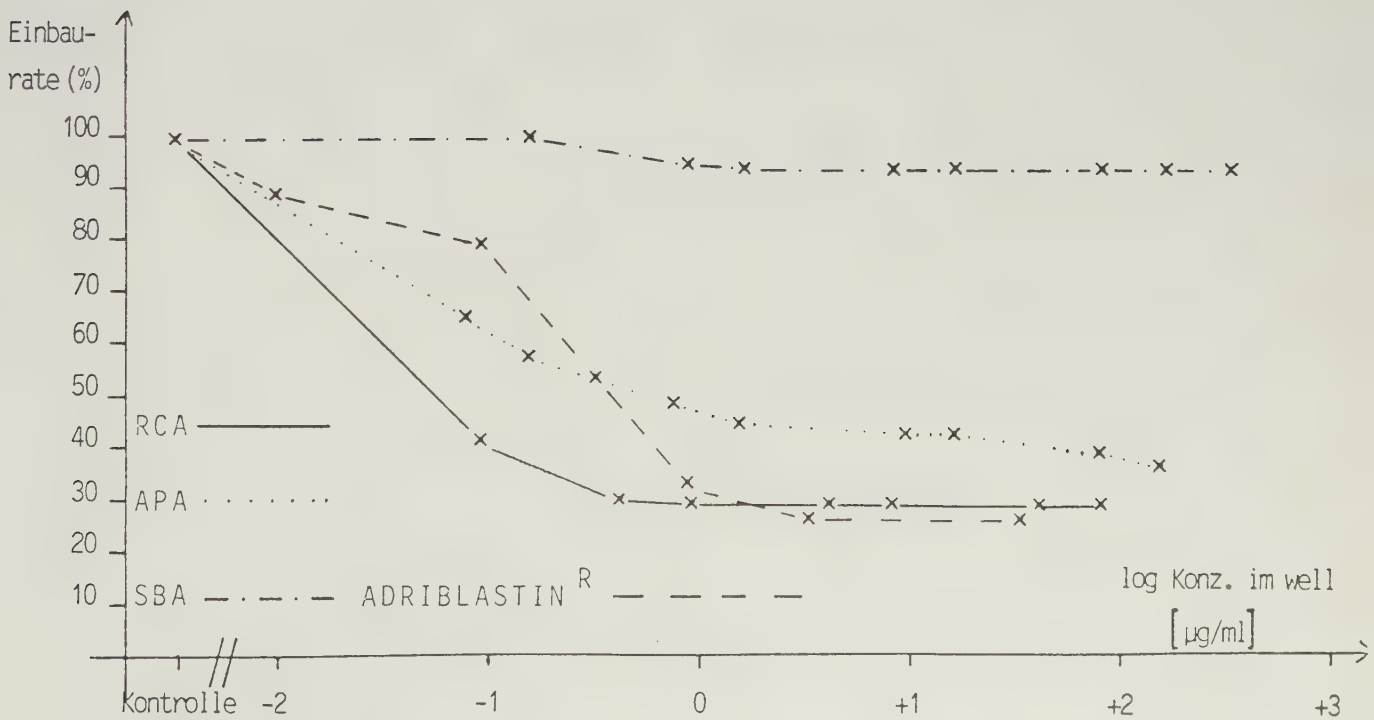


Abbildung 6 Einfluß von Con A, WGA und PNA auf den H^3 -Thymidineinbau von KK-47-Zellen

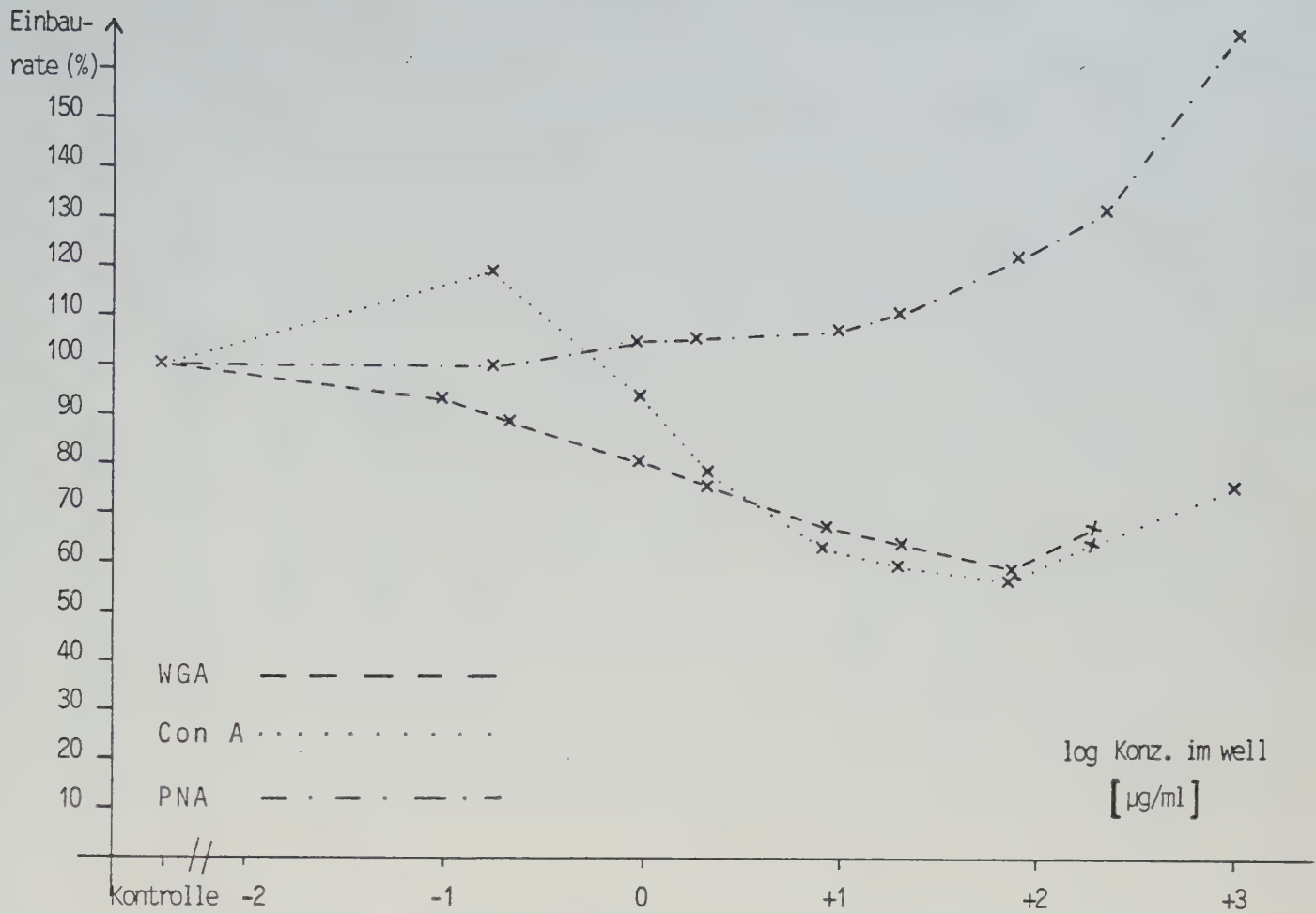


Abbildung 7 Einfluß von Con A, WGA und PNA auf den H^3 -Uridineinbau von KK-47-Zellen

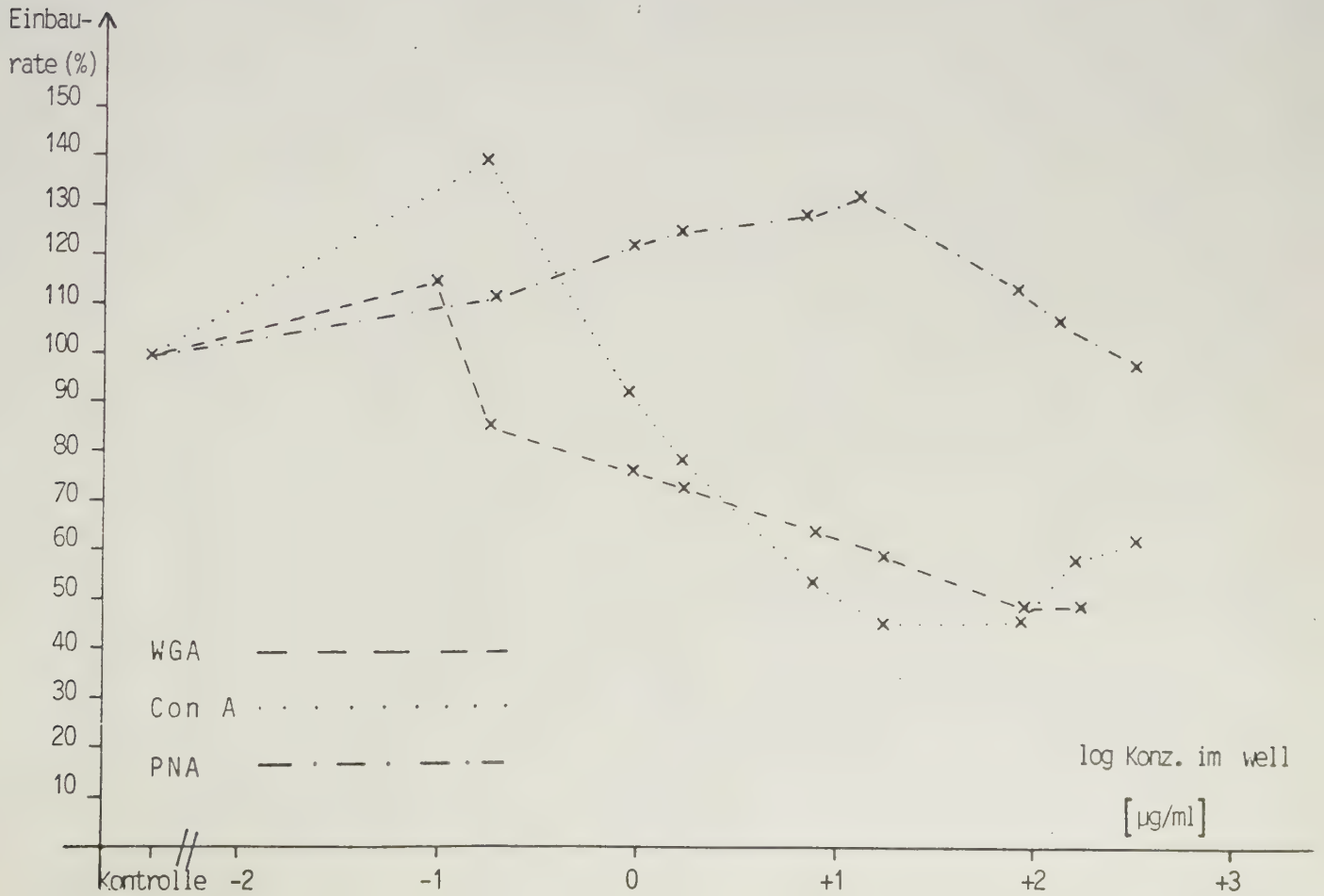


Abbildung 8

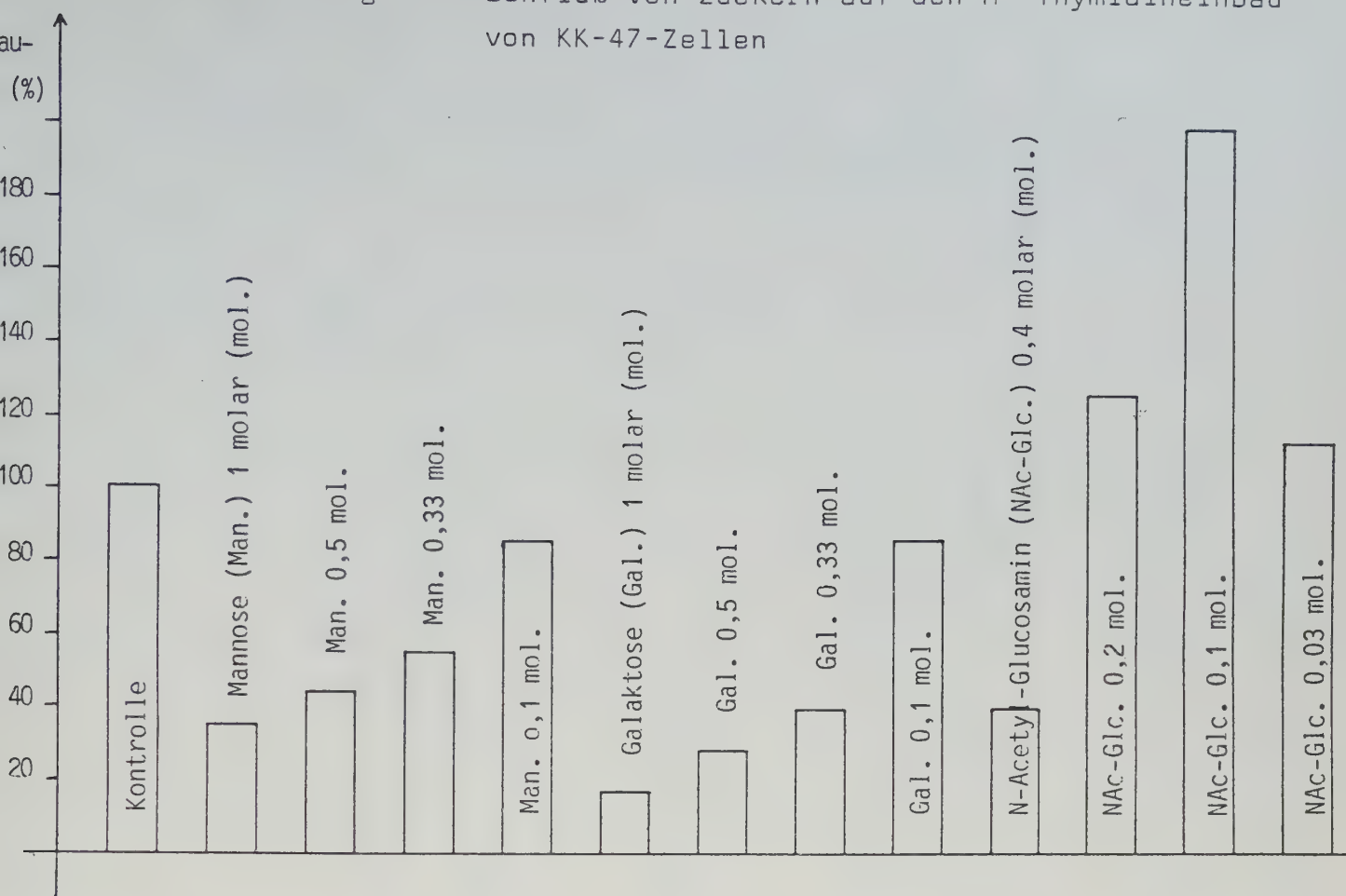
Einfluß von Zuckern auf den H^3 -Thymidineinbau von KK-47-Zellen

Abbildung 9

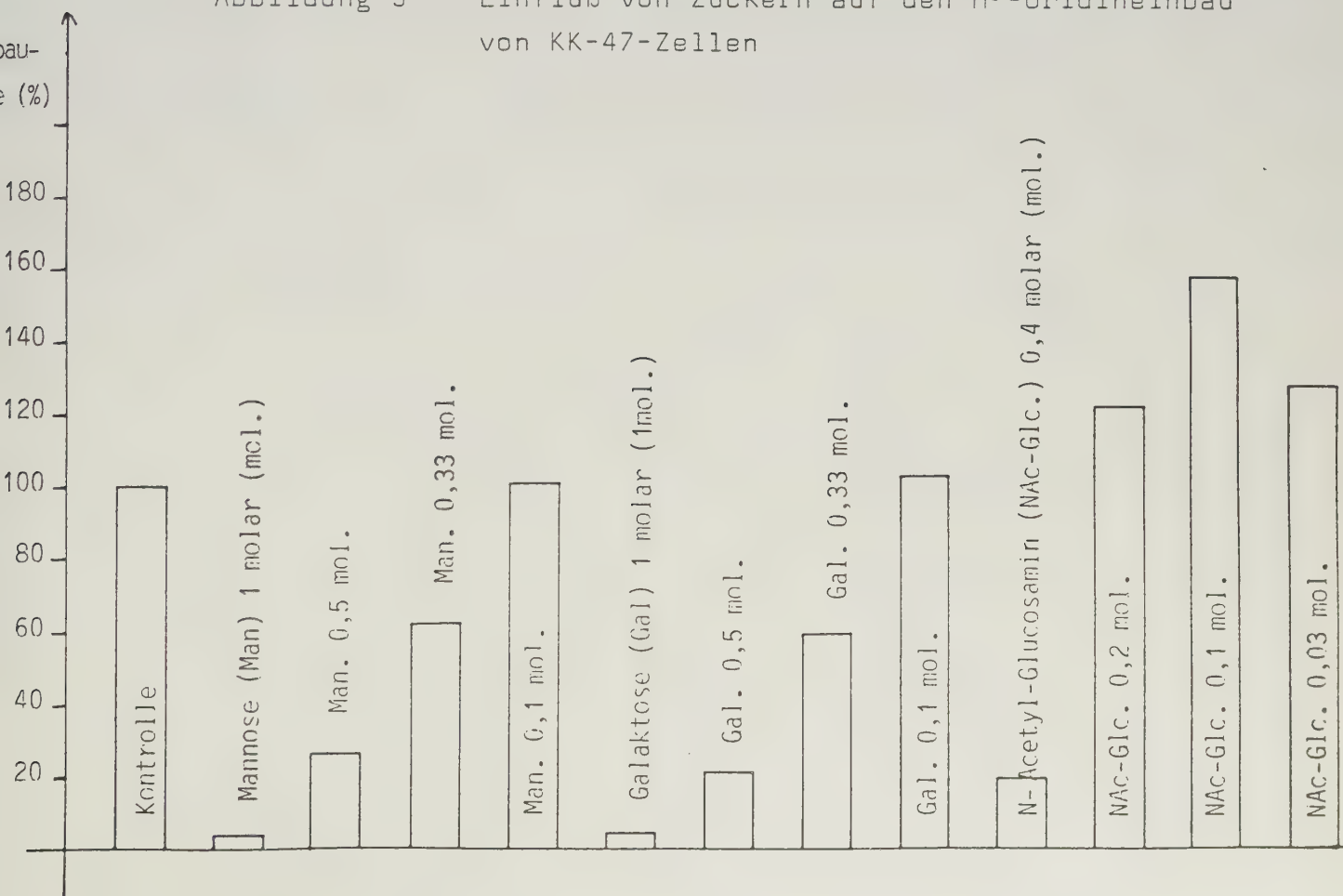
Einfluß von Zuckern auf den H^3 -Uridineinbau von KK-47-Zellen

Abbildung 10 Einfluß von Mannose und CON A auf den
H³-Thymidineinbau von KK-47 Zellen

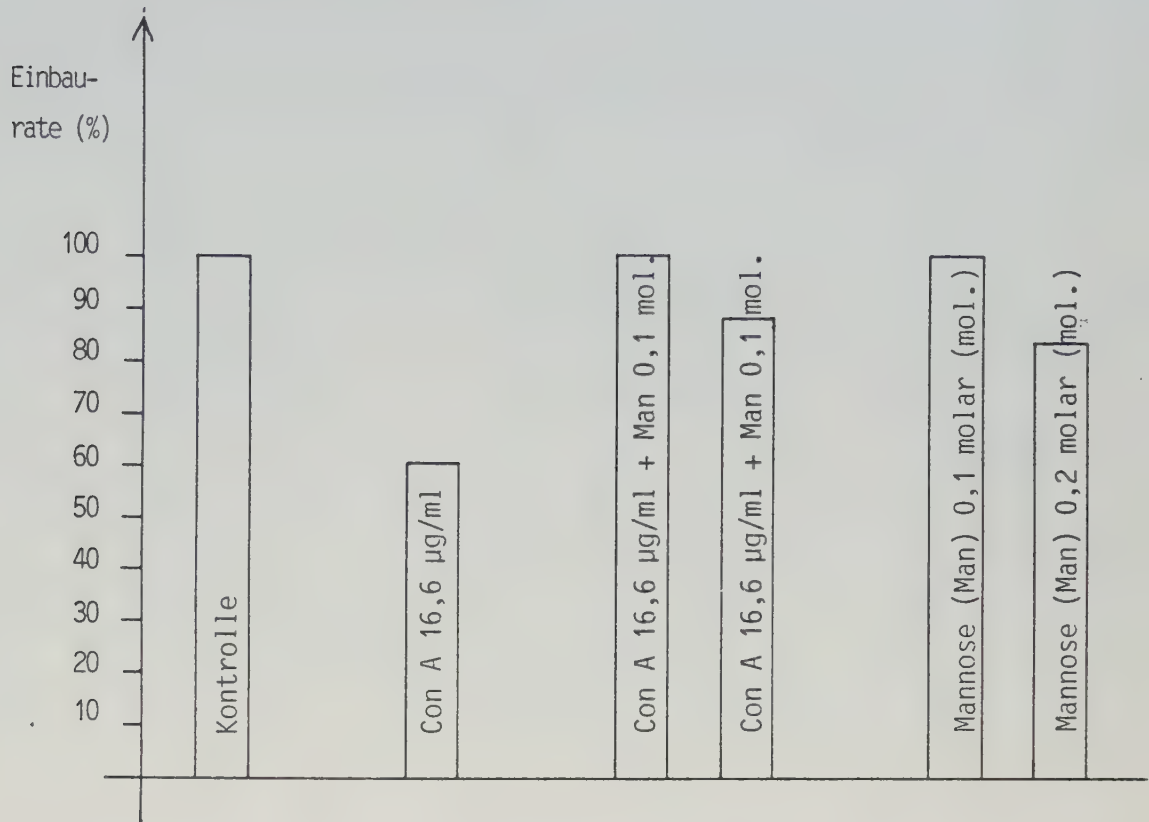


Abbildung 11 Einfluß von Mannose und CON A auf den
H³-Uridineinbau von KK-47-Zellen

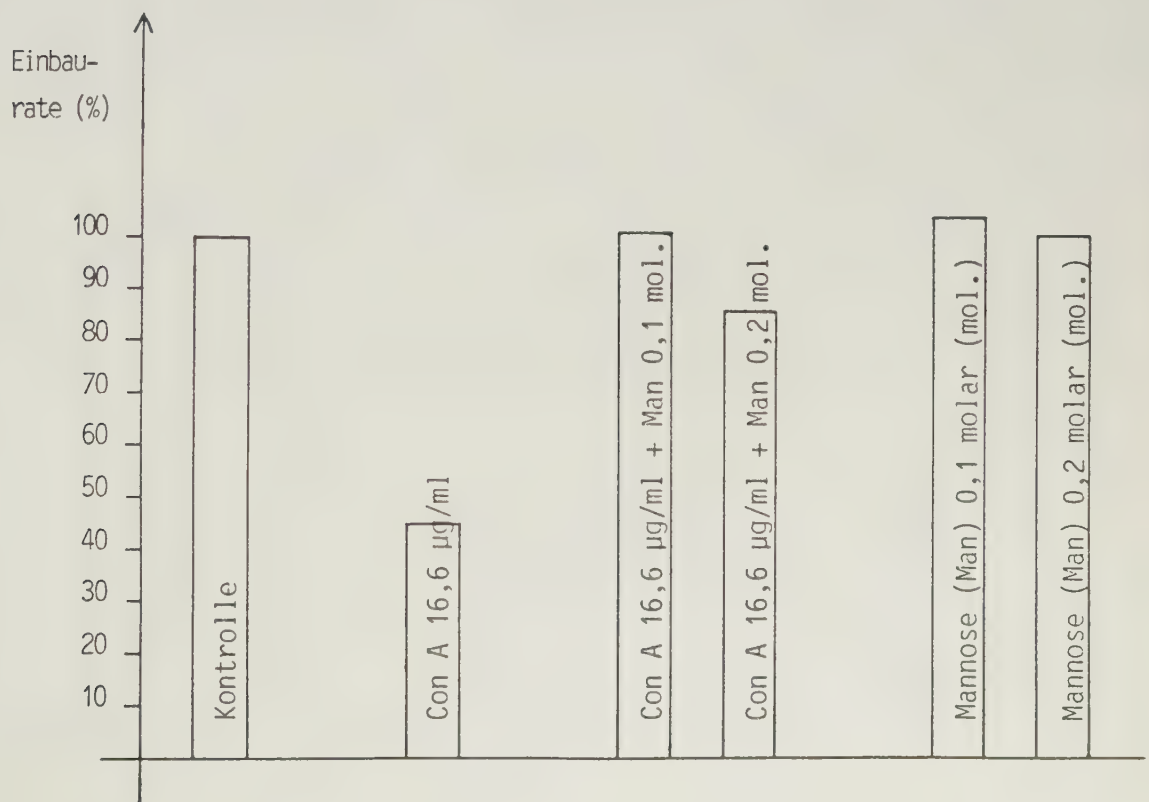


Abbildung 12 Einfluß von Galaktose, RCA und APA auf den H^3 -Thymidineinbau von KK-47 Zellen

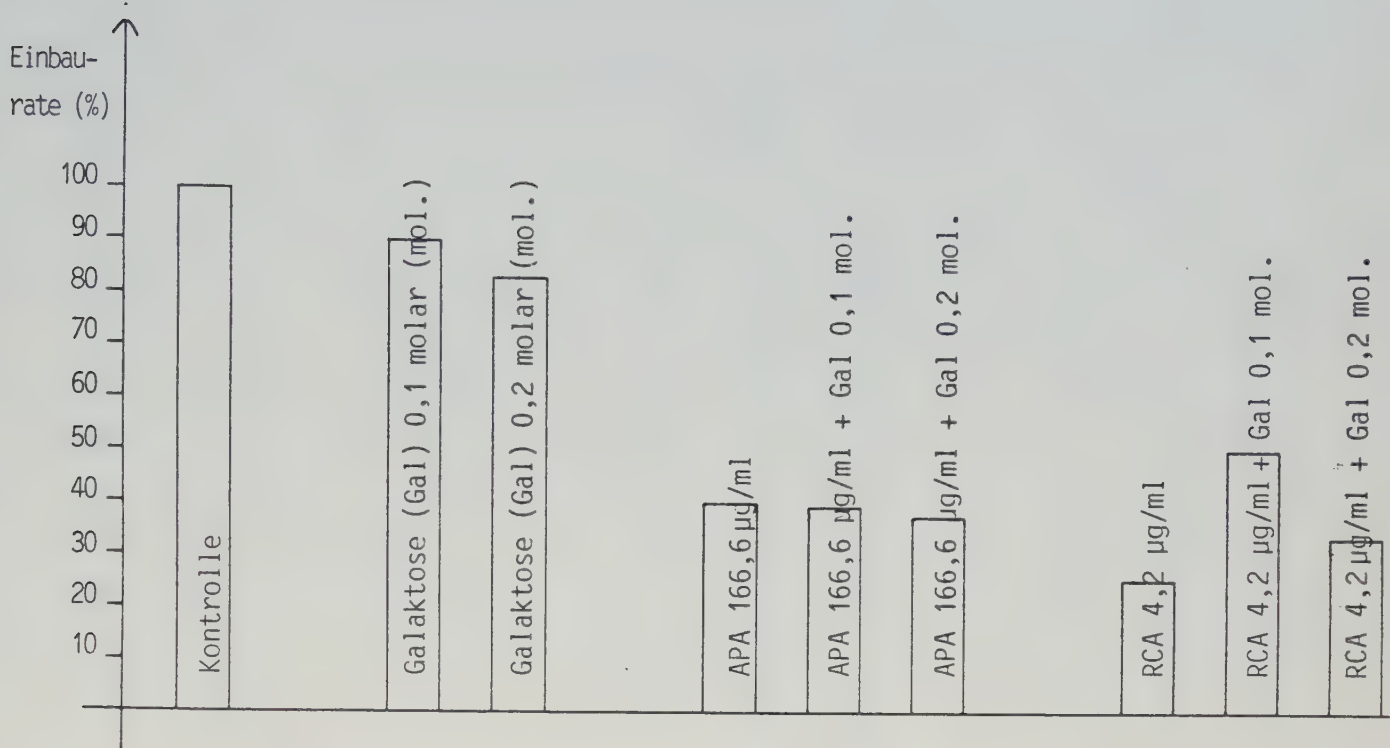


Abbildung 13 Einfluß von Galaktose, RCA und APA auf den H^3 -Uridineinbau von KK-47-Zellen

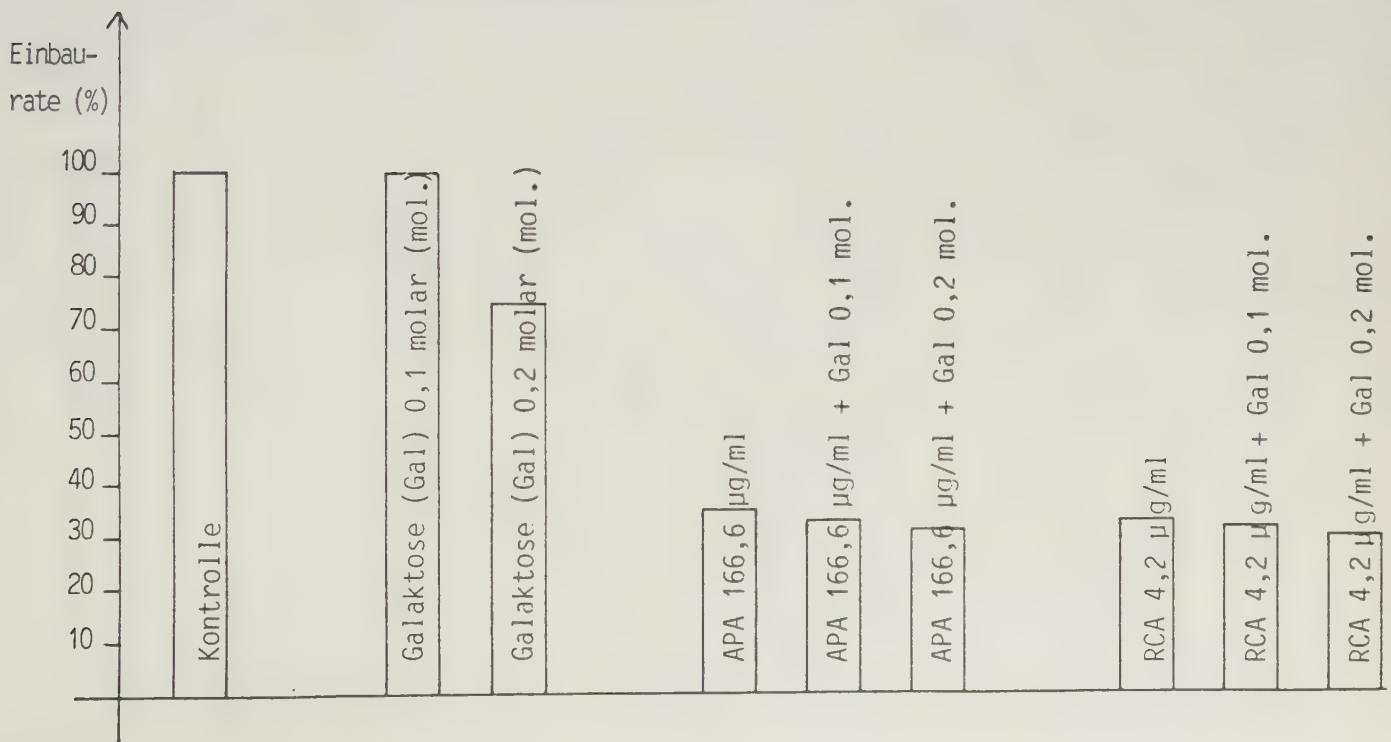


Abbildung 14 Einfluß von NAc-Glc und WGA auf den H^3 -Thymidineinbau von KK-47 Zellen

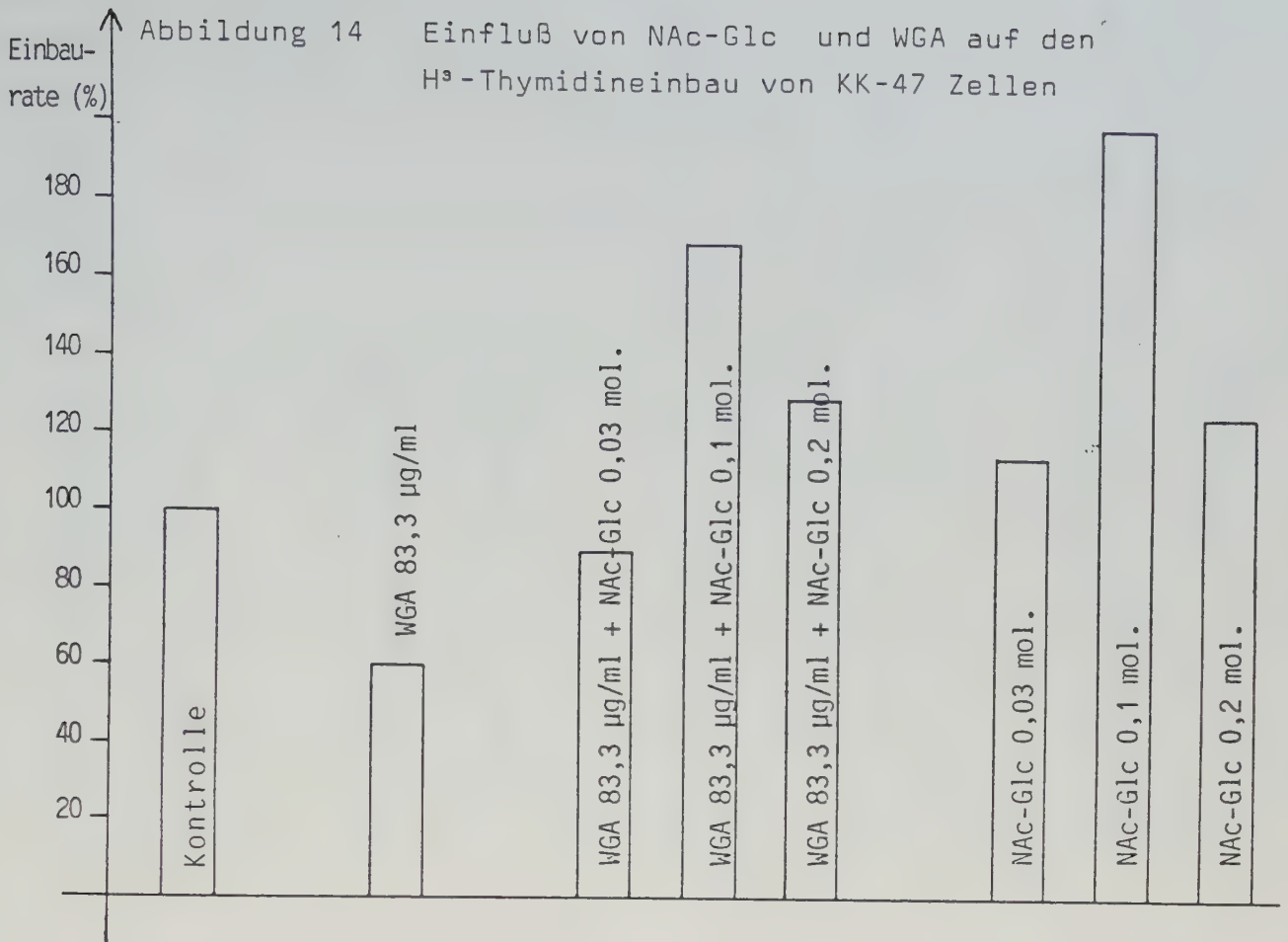


Abbildung 15 Einfluß von NAc-Glc und WGA auf den H^3 -Uridineinbau von KK-47-Zellen

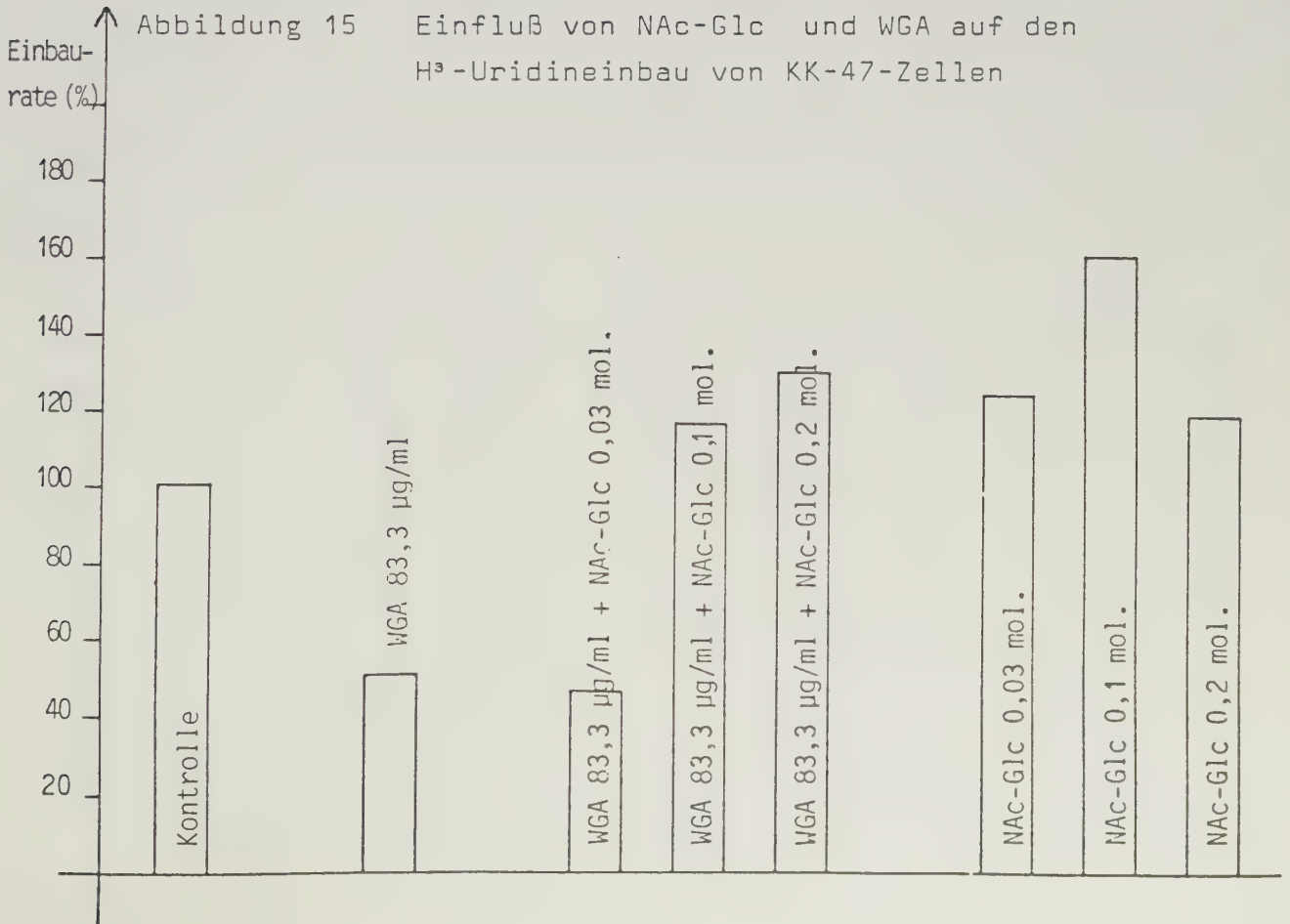


Abbildung 16 Einfluß von Galaktose, PNA und SBA auf den H^3 -Thymidineinbau von KK-47-Zellen

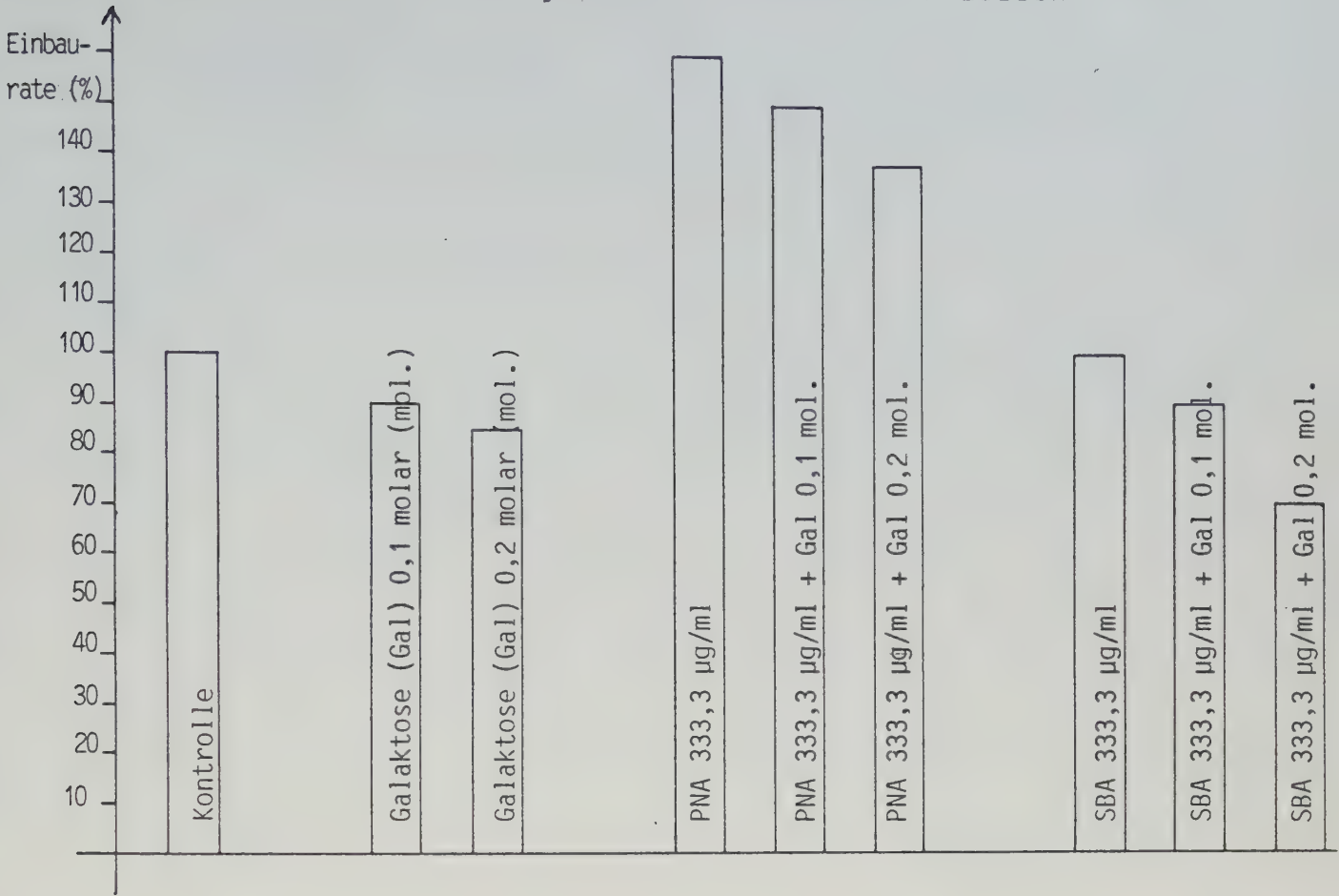


Abbildung 17 Einfluß von Galaktose, PNA und SBA auf den H^3 -Uridineinbau von KK-47-Zellen

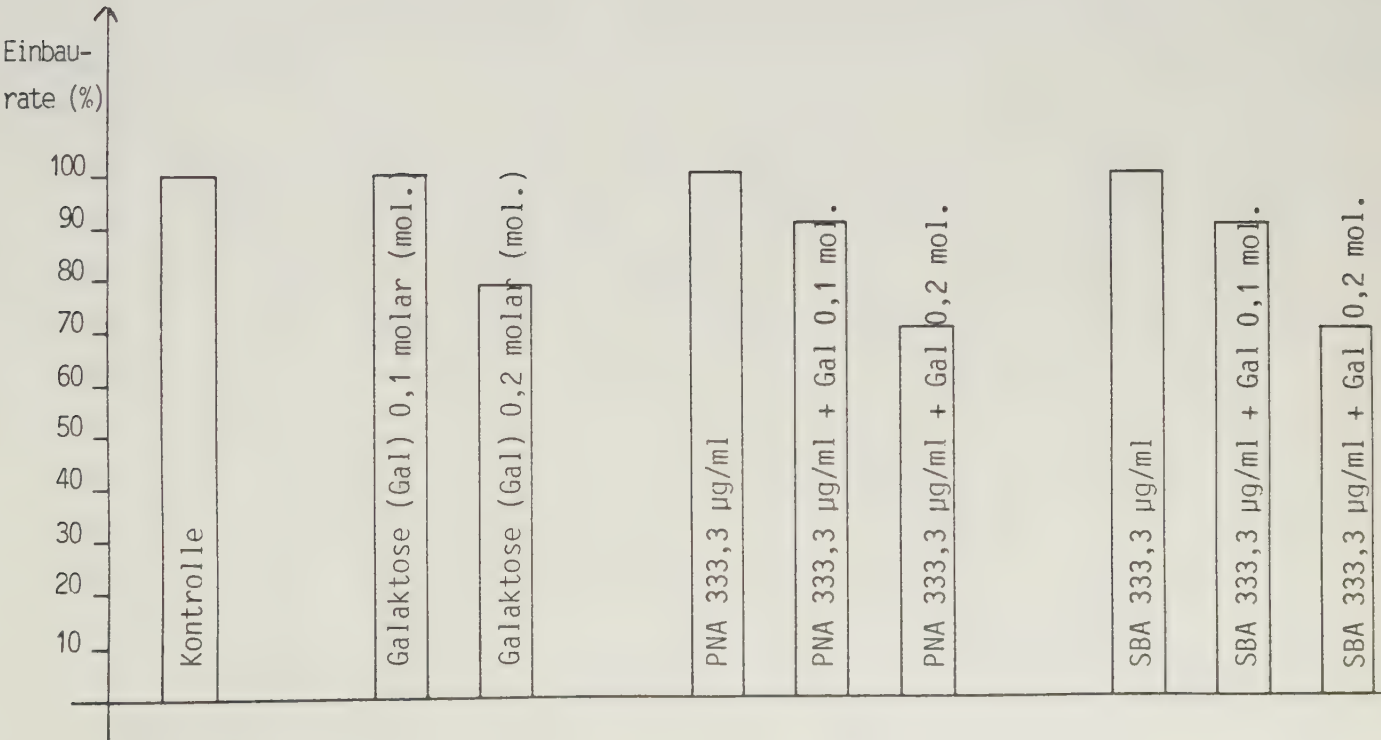


Abbildung 18 Einfluß von CHLAMYDOCIN auf den
H³-Thymidineinbau von KK-47-Zellen

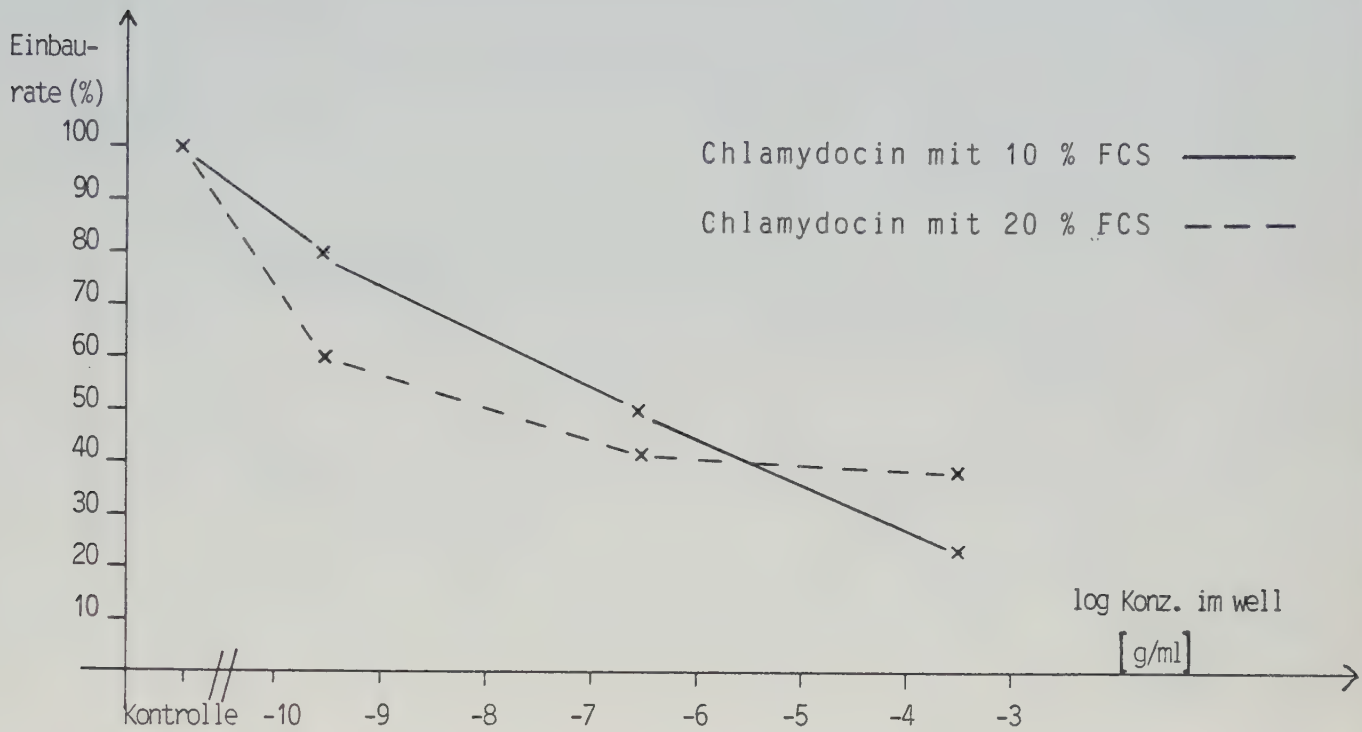


Abbildung 19 Einfluß von CHLAMYDOCIN auf den
H³-Uridineinbau von KK-47-Zellen

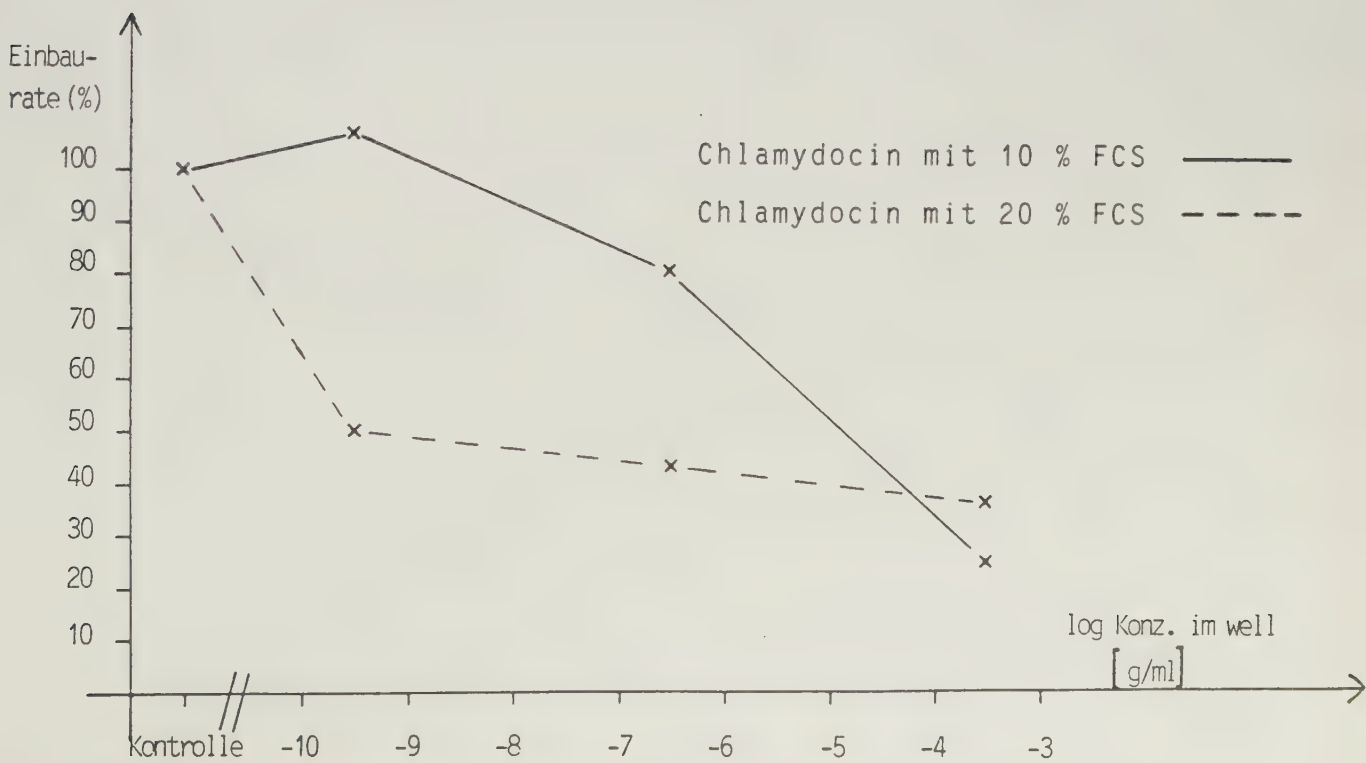


Abbildung 20 Einfluß von ELDISINE^R, ADIRBLASTIN^R, MITOMYCIN^R und PLATINEX^R auf den H³-Thymidineinbau von KK-47-Zellen

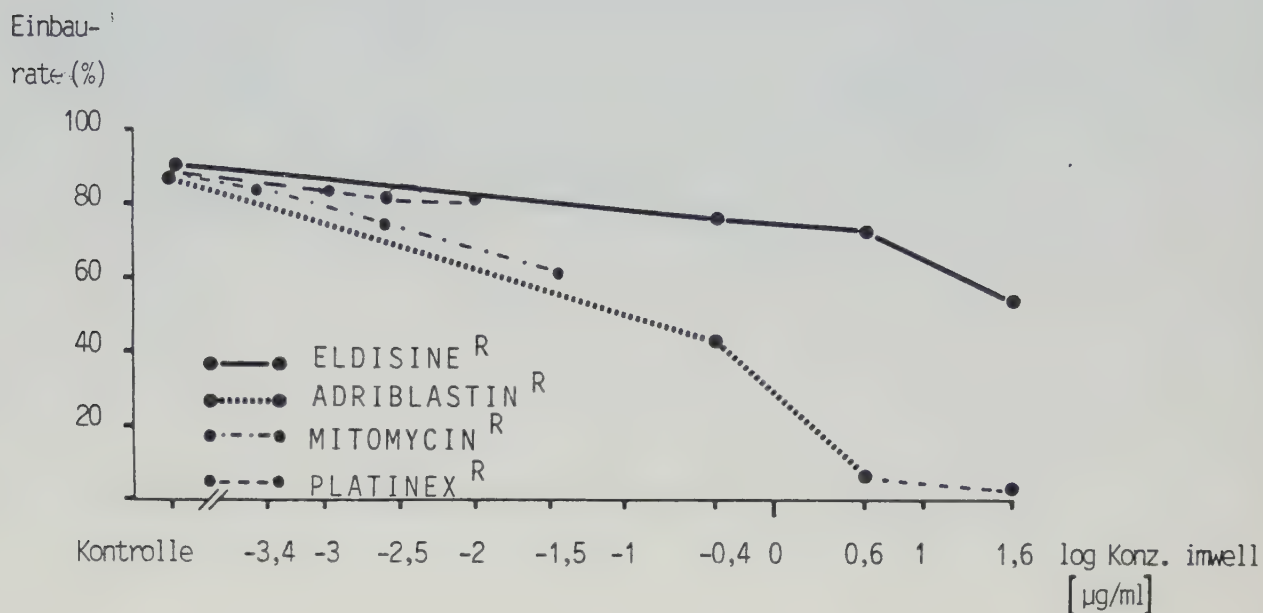


Abbildung 21 Einfluß von ELDISINE^R, ADIRBLASTIN^R, MITOMYCIN^R und PLATINEX^R auf den H³-Uridineinbau von KK-47-Zellen

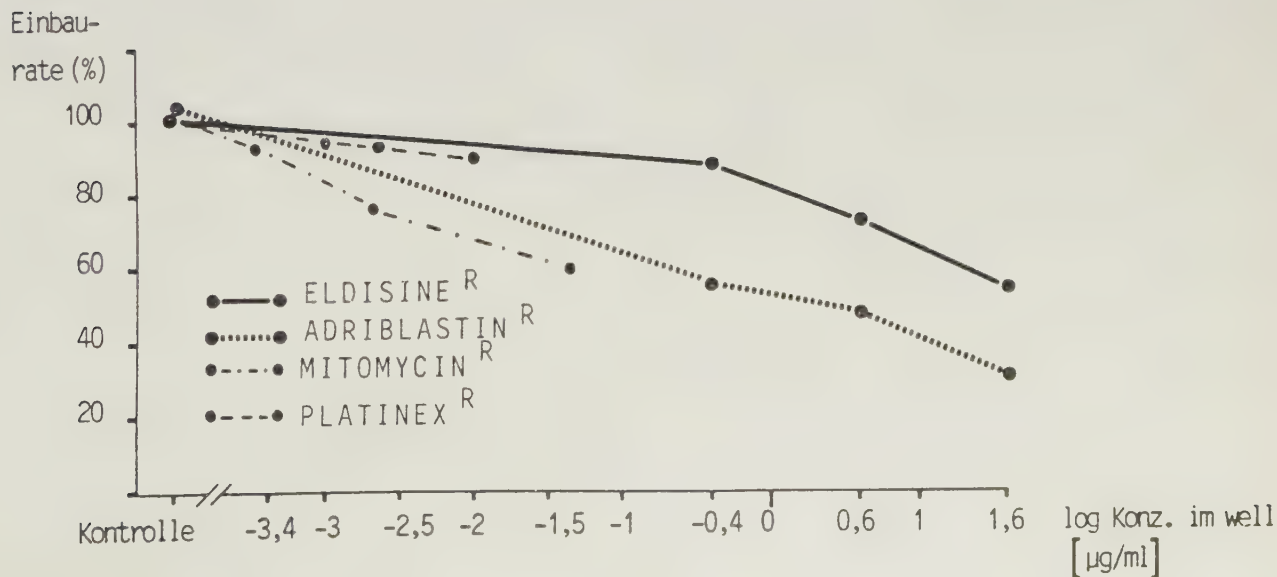


Abbildung 22 Einfluß von CON A, WGA und RCA auf den H^3 -Thymidineinbau von Hypernephromzellen des Patienten 514

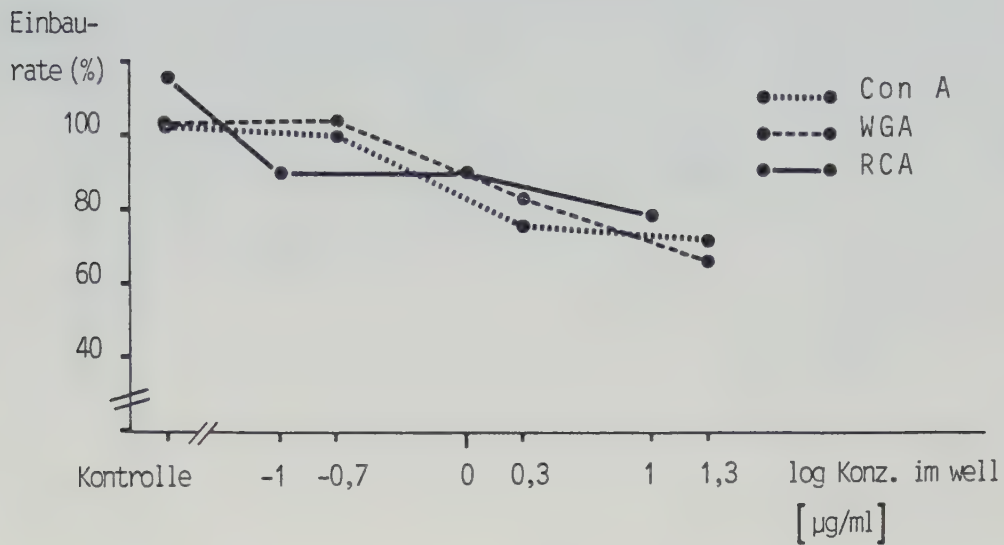


Abbildung 23 Einfluß von CON A, WGA und RCA auf den H^3 -Uridineinbau von Hypernephromzellen des Patienten 514

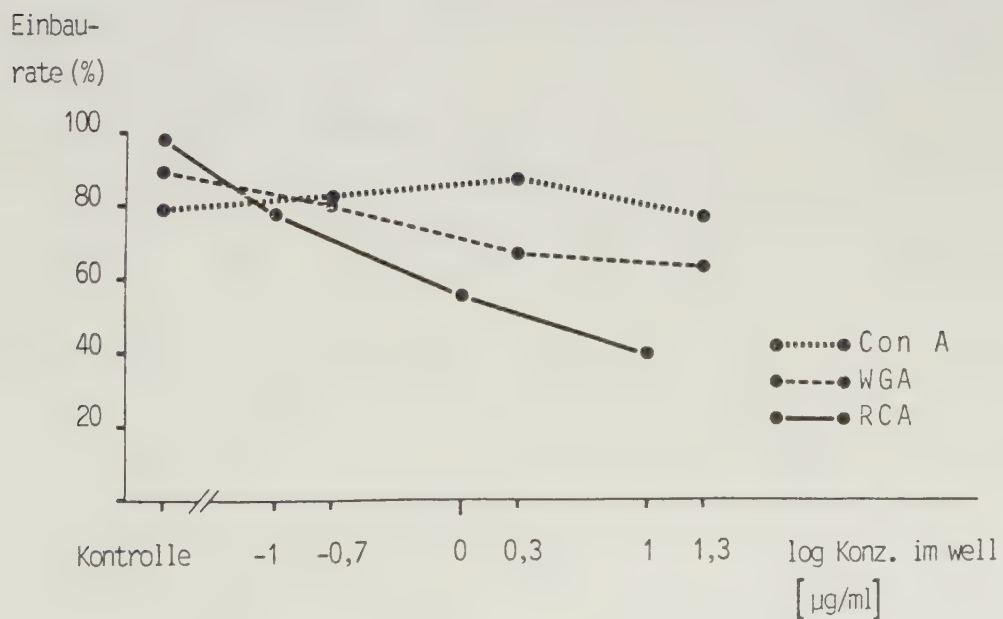


Abbildung 24 Einfluß von CON A, WGA und RCA auf den H^3 -Uridineinbau von Nierenzellen des Patienten 514

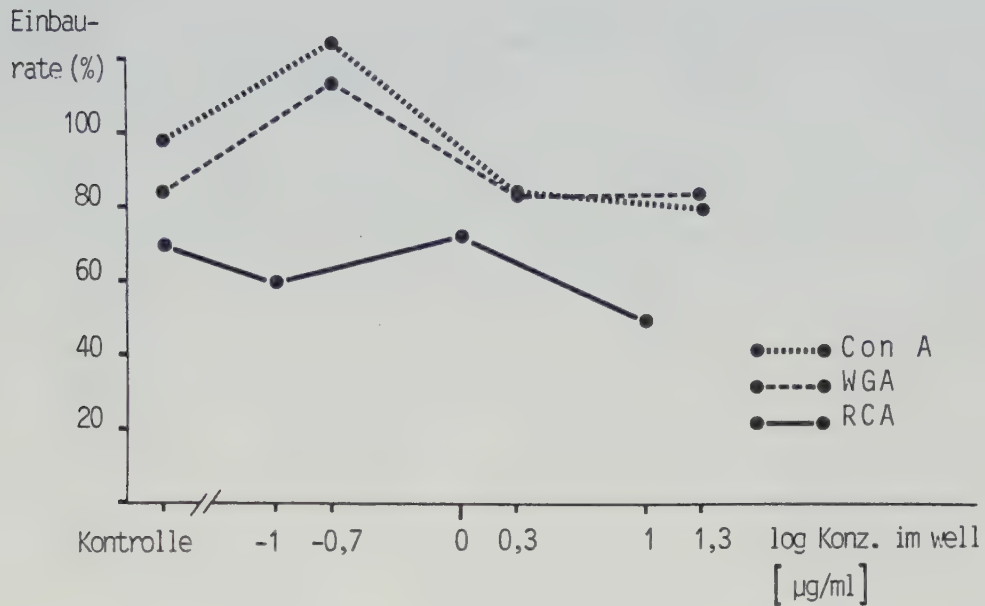


Abbildung 25 Einfluß von CON A, WGA und RCA auf den H^3 -Uridineinbau von Hypernephromzellen des Patienten 561

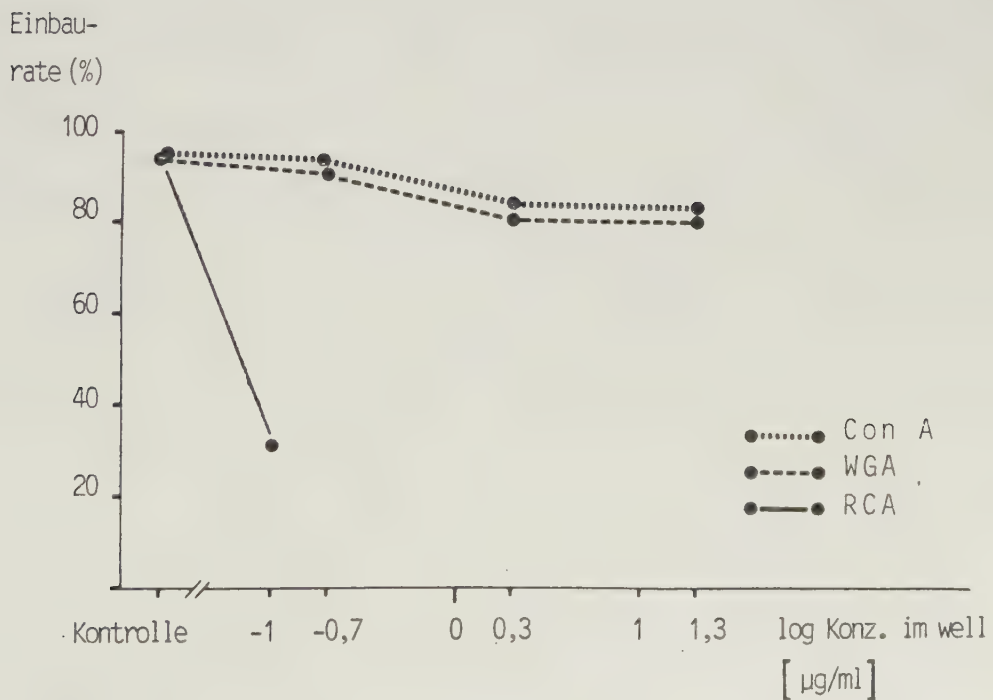


Abbildung 26 Einfluß von CON A, WGA und RCA auf den H^3 -Thymidineinbau von Nierenzellen des Patienten 561

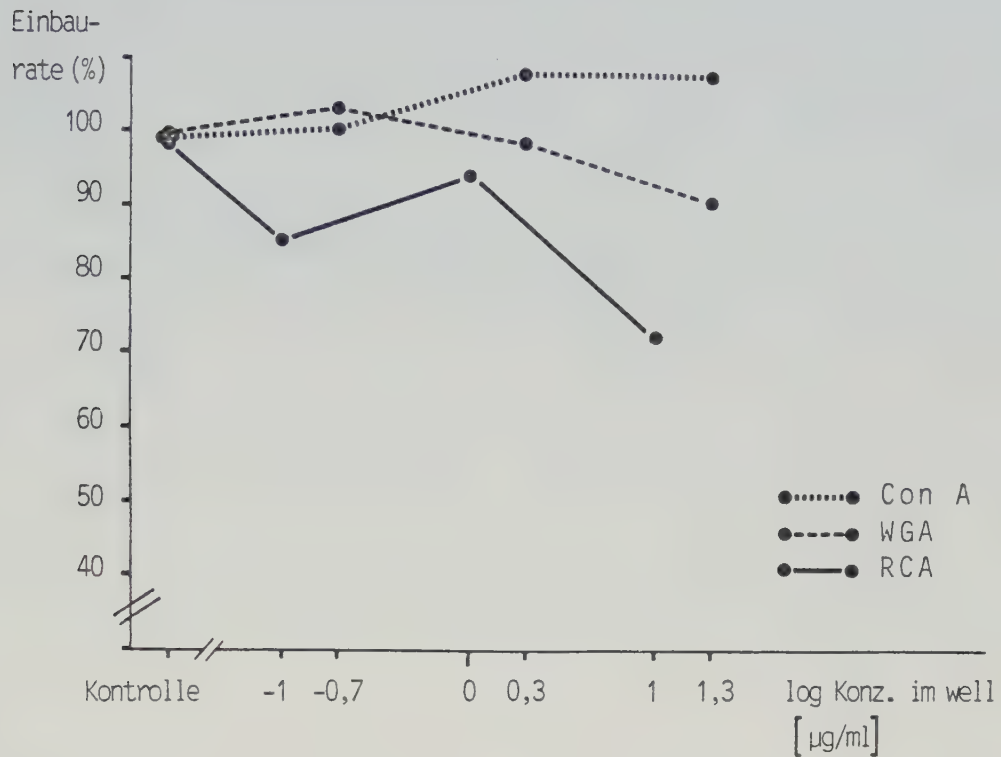


Abbildung 27 Einfluß von CON A, WGA und RCA auf den H^3 -Urididineinbau von Nierenzellen des Patienten 561

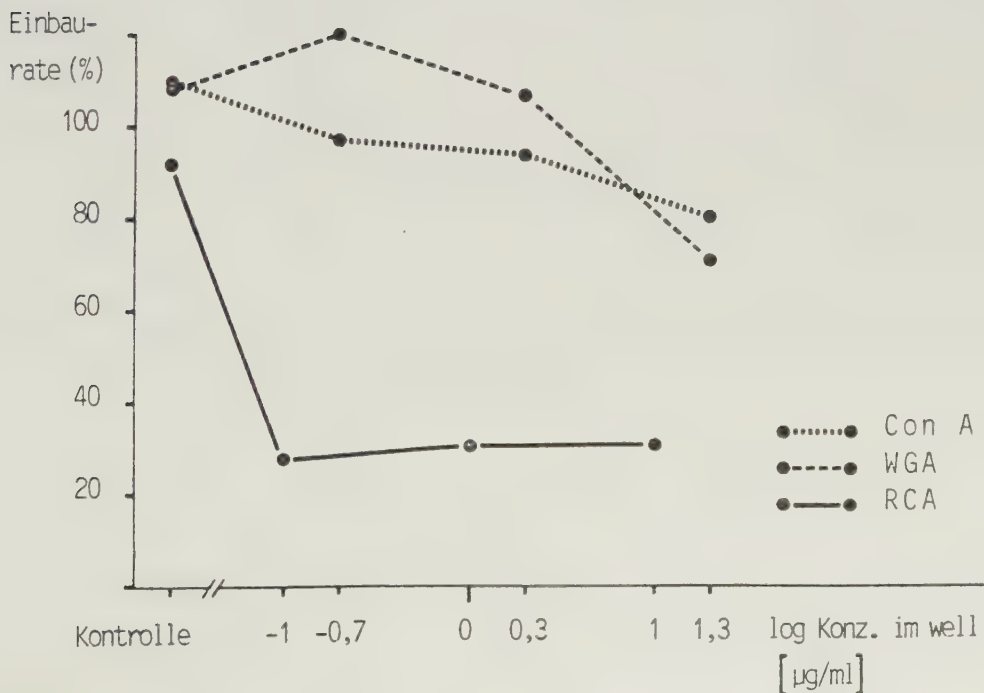


Abbildung 28 Einfluß von CON A, WGA und RCA auf den H^3 -Uridineinbau von Hypernephromzellen des Patienten 513

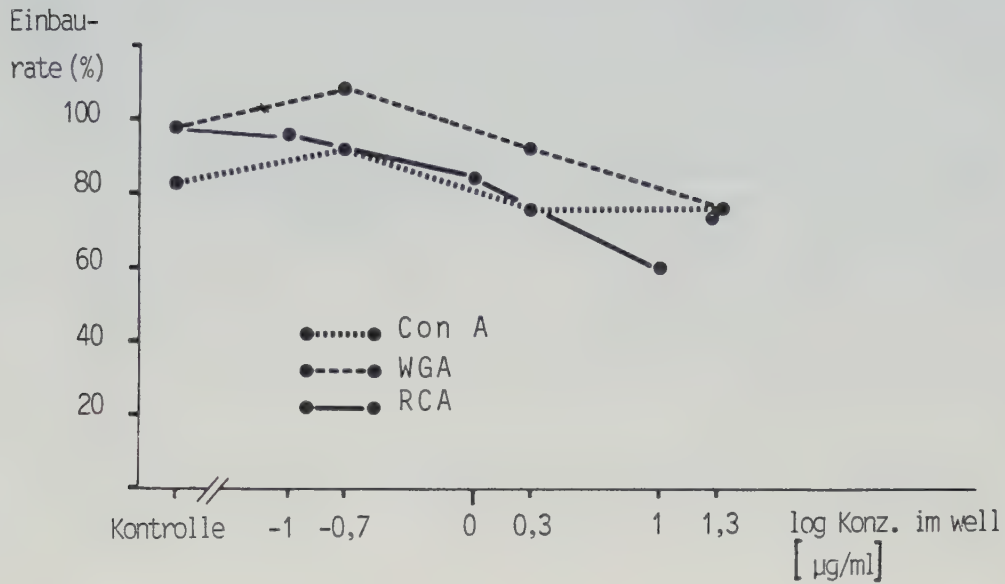


Abbildung 29 Einfluß von CON A, WGA und RCA auf den H^3 -Uridineinbau von Normalzellen des Patienten 513

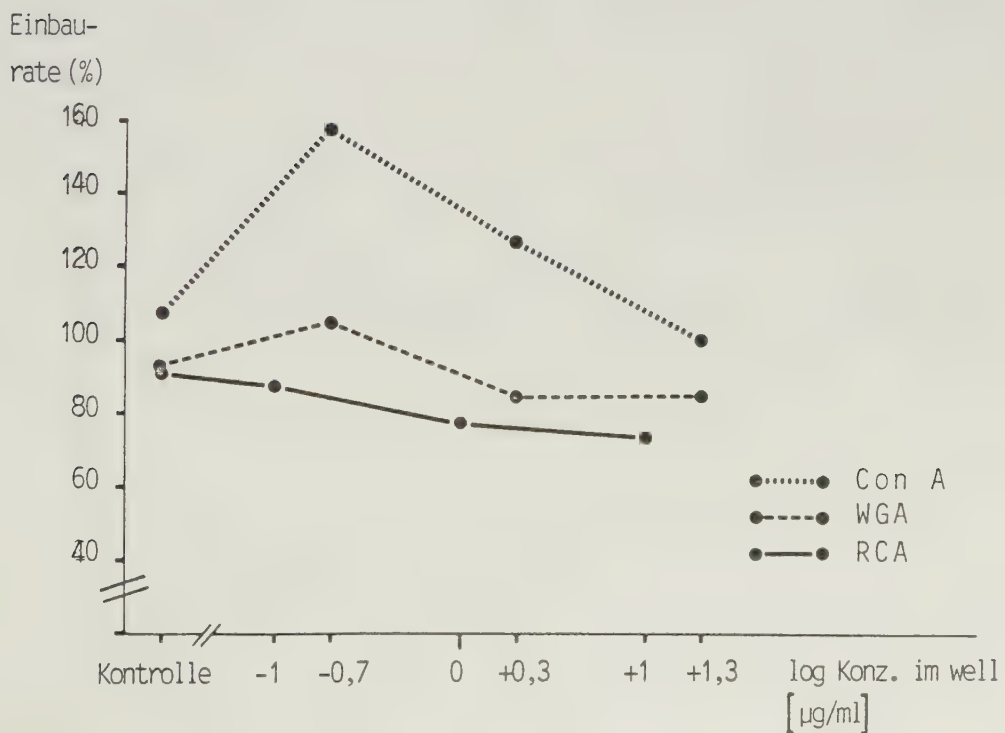


Abbildung 30 Einfluß von MITOMYCIN, PLATINEX, ADRIBLASTIN und ELDISINE auf den H^3 -Thymidineinbau von Hypernephromzellen des Patienten 514

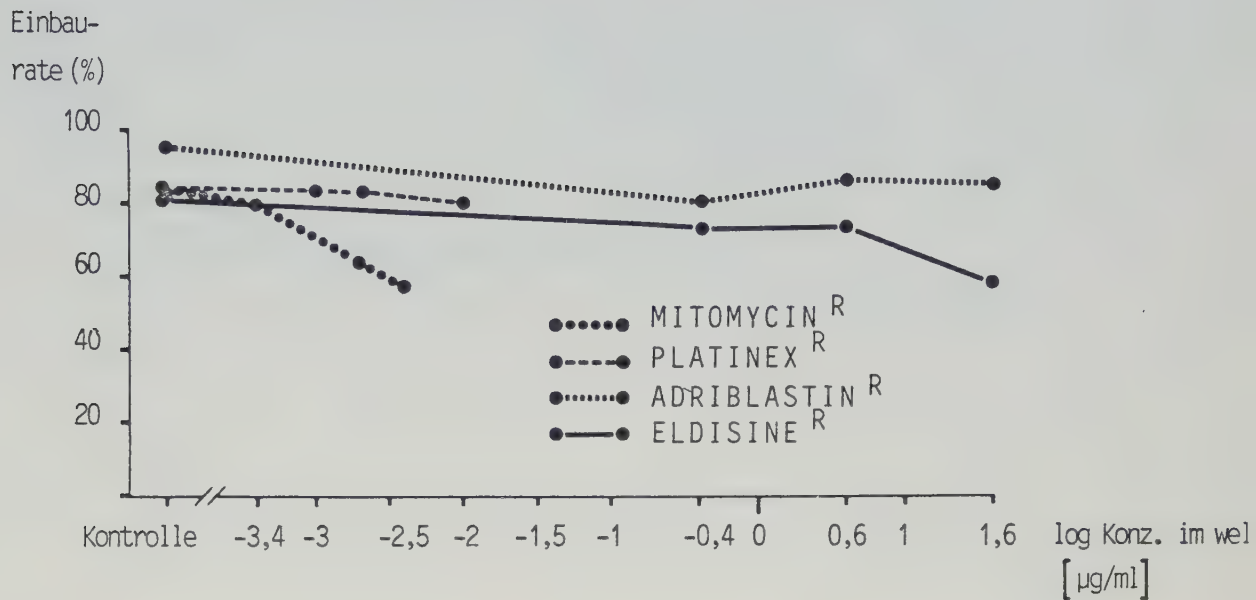


Abbildung 31 Einfluß von PLATINEX, ADRIBLASTIN und ELDISINE auf den H^3 -Uridineinbau von Hypernephromzellen des Patienten 514

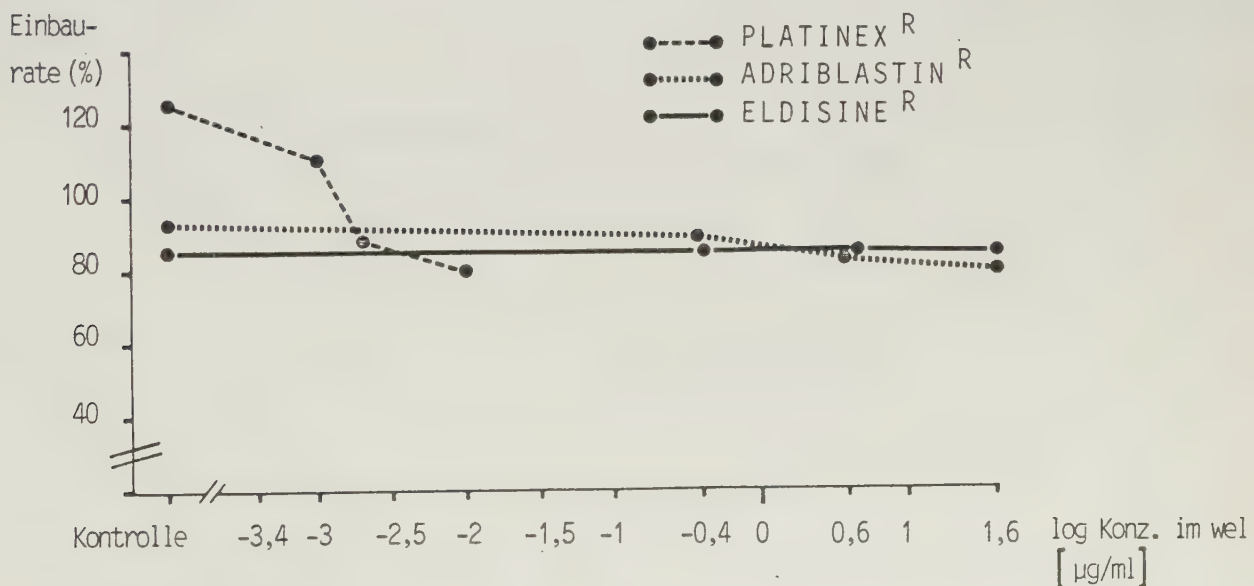


Abbildung 32 Einfluß von MITOMYCIN, PLATINEX, ADIRIBLASTIN und ELDISINE auf den H^3 -Uridineinbau von Hypernephromzellen des Patienten 513

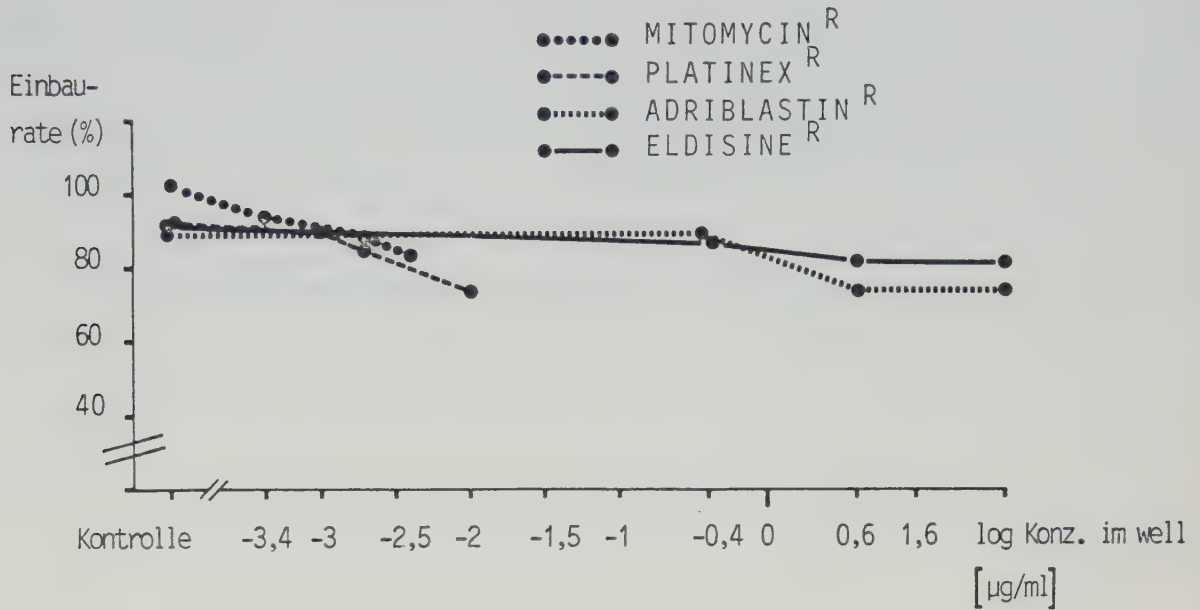


Abbildung 33 Einfluß von MITOMYCIN, PLATINEX, ADIRIBLASTIN und ELDISINE auf den H^3 -Uridineinbau von Hypernephromzellen des Patienten 561

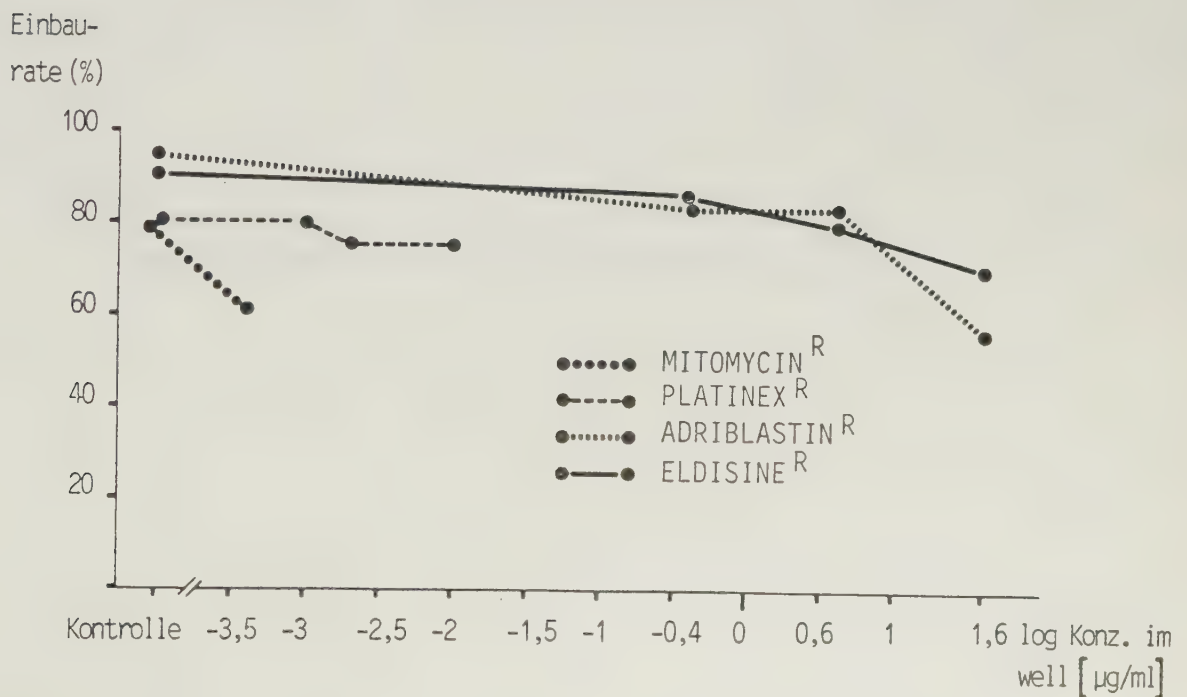


Abbildung 34 Einfluß von MITOMYCIN, PLATINEX, ADIRIBLASTIN und ELDISINE auf den H^3 -Uridineinbau von Nierenzellen des Patienten 513

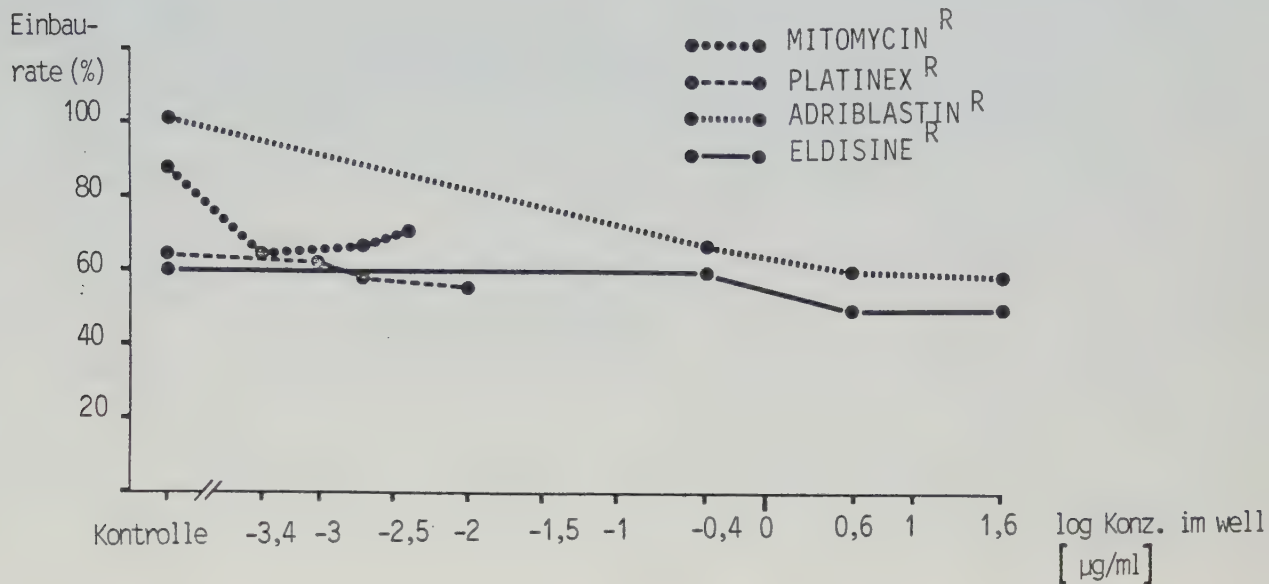


Abbildung 35 Einfluß von MITOMYCIN, PLATINEX, ADIRIBLASTIN und ELDISINE auf den H^3 -Uridineinbau von Nierenzellen des Patienten 514

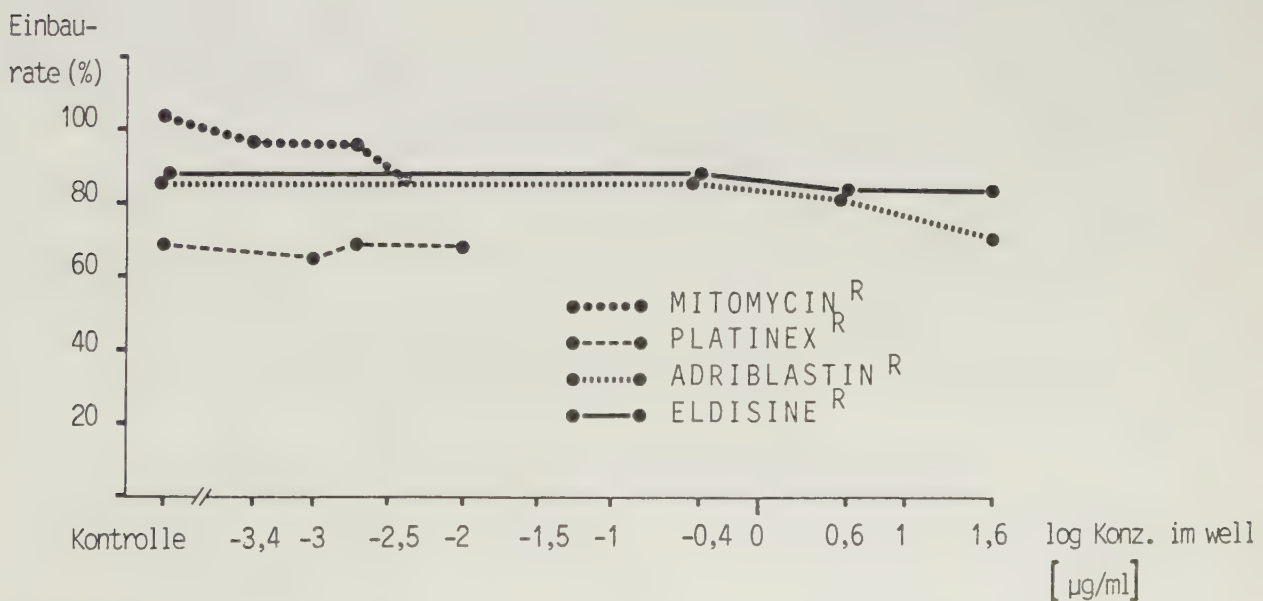


Abbildung 36 Einfluß von PLATINEX, ADIRIBLASTIN und ELDISINE auf den H^3 -Thymidineinbau von Nierenzellen des Patienten 561

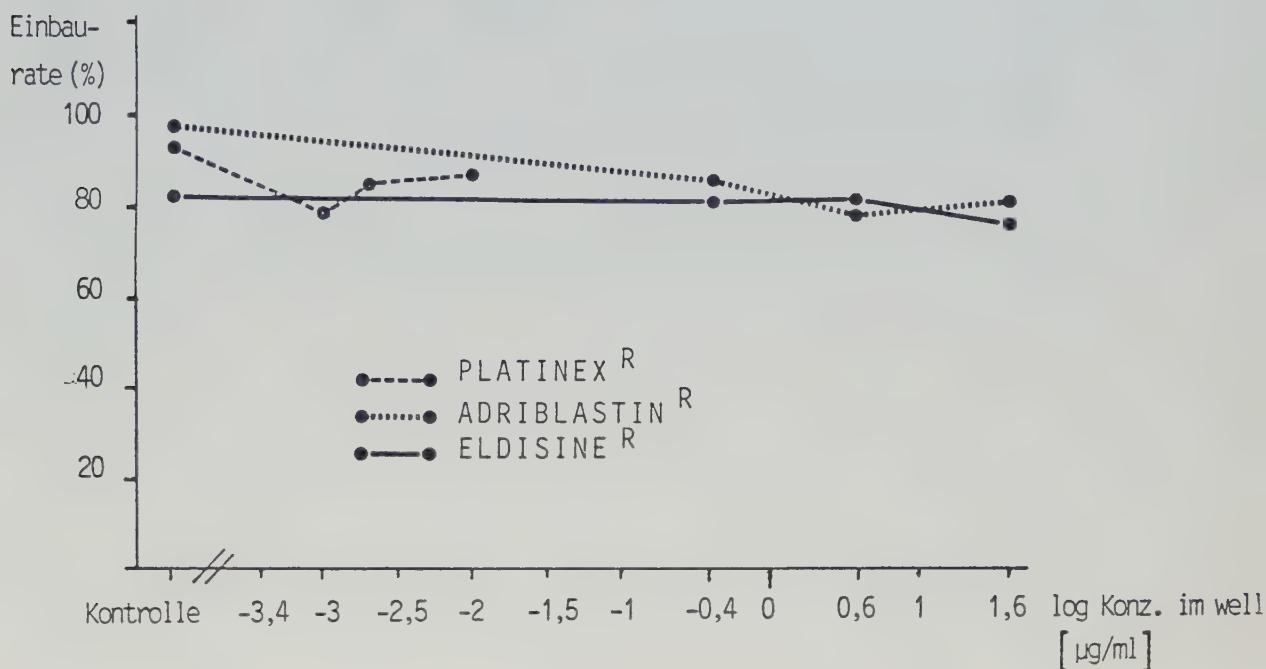
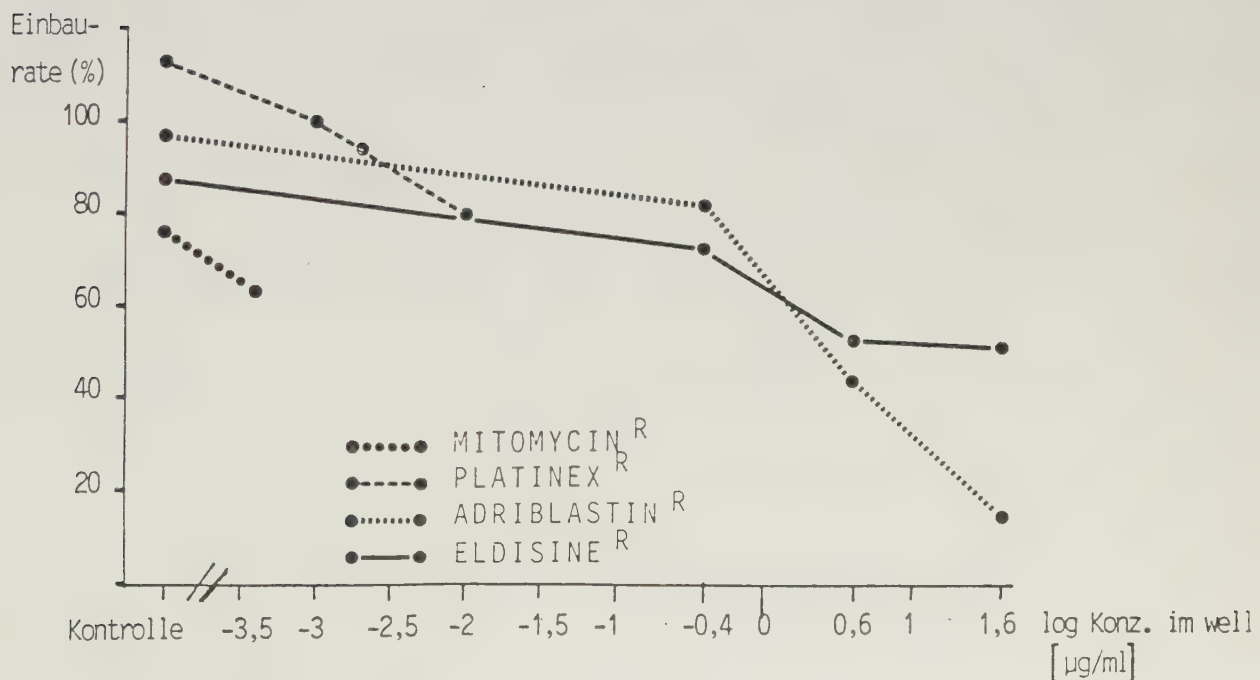


Abbildung 37 Einfluß von MITOMYCIN, PLATINEX, ADIRIBLASTIN und ELDISINE auf den H^3 -Uridineinbau von Nierenzellen des Patienten 561



5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Methode

Ziel unserer Untersuchungen war es, verschiedene potentiell zytotoxische Substanzen in ihrem Einfluß auf die Blasentumorzelllinie KK-47 und das hypernephroide Nierenkarzinom zu testen.

Es gibt hierfür verschiedene in-vivo- und in-vitro-Testmethoden.

5.1.1 In-vivo-Testmethoden

Bei diesen Verfahren wird versucht, unter möglichst physiologischen Verhältnissen die Tumoren des Menschen am Tier zu testen. Dabei können neben Zytostatika auch andere Behandlungsmaßnahmen, z.B. Bestrahlung, getestet werden (MATTERN, 1982).

Folgende Methoden wurden hierfür entwickelt:

1. Diffusionskammersystem (HECKMANN, 1967)
2. Heterotransplantation von Tumorgewebe in Backentaschen von Hamstern (GOLDBERG, 1967)
3. Heterotransplantation in Gehirne von Mäusen (BERENBAUM, 1974)
4. Heterotransplantation in immungeschädigten Mäusen (STEEL, 1978; Kurth, 1983)
5. Heterotransplantation in die Nierenkapsel immunkompetenter Mäuse (BOGDEN, 1981; KURTH, 1984)

5.1.1.1 Diffusionskammersystem

Nach Gewinnung von menschlichen Tumorzellen durch Trypsinsierung wird eine Zellsuspension in eine Diffusionskammer eingebracht. Diese besteht aus zwei semipermeablen Membranfiltern (Zelluloseester), die an der Ober- und Unterseite eines Teflonringes ineinander verschraubt werden. Die semipermeable Membran läßt weder Lymphozyten noch Plasmazellen noch Makrophagen des Wirtstieres diffundieren. Die Diffusionskammer wird in einen Wirt (z.B. Ratte) intraperitoneal implantiert. Nach fünf Tagen sind die Tumorzellen auf der Platte zu einem Zellrasen ausgewachsen. Hierauf wird das gewünschte Zytostatikum in einer für den Menschen äquivalenten Dosis dem Wirtstier verabreicht. 48 Stunden nach der letzten Injektion erfolgt die Entnahme der Kammer und deren Auswertung (z.B. durch Papanicolaou-Färbung oder Zellzählung). Die Anwachsrate beträgt nahezu 100 % (HECKMANN, 1967). Es finden keine Abstoßungsreaktionen statt.

5.1.1.2 Heterotransplantationsmodelle

Bei dieser Methode werden durch Bestrahlung immuninkompetent gemachte Tiere (Mäuse, Ratten, Hamster) verwendet. Excisate menschlicher Tumoren definierter Größe werden den Versuchstieren subepidermal in die Backentasche, am Nacken oder intraperitoneal eingepflanzt. Anschließend wartet man, bis die Tumoren zu einer meßbaren Größe herangewachsen sind. Die zu testenden Zytostatika werden den Versuchstieren in einer beim Menschen verwendeten Konzentration verabreicht. Gemessen wird entweder das Verhalten des Tumorwachstums oder die Überlebenszeit, bezogen auf eine Kontrollgruppe (BATEMAN, 1980; OTTO, 1984).

5.1.1.3 Heterotransplantation unter die Nierenkapsel immunkompetenter Mäuse

Hierbei werden durch Heterotransplantation auf immuninkompetente Mäuse ("Nacktmäuse") und anschließende Kultivierung gezüchtete Nierenkarzinomzelllinien verwendet. Dieses Tumormaterial wird in die Nierenkapsel immunkompetenter oder vorbestrahlter Mäuse implantiert. Es können aber auch frische Tumorexcisate eingepflanzt werden. Da die Nierenkapsel transparent ist, können Tumorgrößenmessungen in situ erfolgen. Die Tumorgröße wird am Tag 0 und Tag 6 gemessen (BOGDEN, 1981; KURTH, 1984). Einige Autoren (KURTH) schließen an die in-vivo-Versuche noch in-vitro-Versuche an, um die verschiedenen Modelle vergleichen zu können.

5.1.1.4 Vorteile von in-vivo-Modellen

1. Nachahmung der physiologischen Stoffwechselvorgänge
2. Nachahmung der verschiedenen Therapieschemata
3. Zytostatikakombinationen testbar
4. Einwirken von Medikamenten über mehrere Zellzyklen möglich
5. Aktivierungs- und Metabolisierungsvorgänge von Zytostatika können nachgeahmt werden (MATTERN, 1982; KURTH, 1984)

5.1.1.5 Nachteile von in-vivo-Modellen

1. Sehr unterschiedliche und teils sehr niedrige Angeh-raten von verschiedenen Tumorarten in den Tieren
2. Lange Versuchsdauer (Wochen bis Monate), da erst die zweite Tiergeneration therapierbar ist

3. Weitgehend unbekannte Einflüsse des Wirtstieres auf das Tumorwachstum
4. Hohe Kosten
5. Probleme mit dem neuen Tierschutzgesetz (KURTH, 1983; MATTERN, 1982)

5.1.2 In-vitro-Testmethoden

Die in-vitro-Testverfahren werden in folgende große Gruppen unterteilt:

1. Morphologische Tests
2. Tests, die die Zellebensfähigkeit messen
3. Messung der primären Angriffspunkte von Zytostaktika
4. Messung der Inhibition des zellulären Metabolismus
5. Messung des Einbaus von radioaktiv-markierten Vorstufen in DNS und RNS
6. Messung der Reproduktionsfähigkeit (VON HOFF, 1980; HAMBURGER, 1981)

5.1.2.1 Morphologische Tests

Hierbei werden an Zellkulturen morphologische Veränderungen (Veränderung der Kerne und Kernplasmarelation, Änderungen des Wachstumsverhaltens) bestimmt (DENDY, 1970). Dieser Test ist zahlreichen subjektiven Einflüssen unterworfen. Entscheidend wird er durch die Erfahrung des Untersuchers geprägt, der die teils sehr schwierige Unterscheidung von Tumor- und Stromazellen vornehmen muß. Änderungen in der Morphologie haben nicht immer eine Änderung im Vermehrungsverhalten zur Folge (VON HOFF, 1980). Es ist unmöglich, die Kulturen zu standardisieren und die Ergebnisse zu quantifizieren (HAMBURGER, 1981). Außerdem treten

technische Probleme wie Wachstumsunfähigkeit vieler Patientenzellen, Zeitdauer des Tests, Abhängigkeit von äußeren Einflüssen und Findungsprobleme der richtigen Konzentration hinzu (HAMBURGER, 1981). Die in-vitro-/Patientenkorrelation zeigt sehr schlechte Ergebnisse (WRIGHT, 1962; LICKISS, 1974). Diese Testmethode ist daher nicht anwendbar.

5.1.2.2 Tests, die die Zellebensfähigkeit messen

Bei Verlust der Lebensfähigkeit ist die Zellmembran nicht mehr in der Lage, Vitalfarbstoffe vom Zellinneren fernzuhalten. Verwendete Vitalfarbstoffe sind Trypanblau, Eosin und Nigrosin (BHUYAN, 1976). Dieser Test ist wiederum abhängig vom Untersucher, der zwischen Normal-/Tumorzellen und durch Zytostatika veränderten Zellen unterscheiden muß. Bei schnell proliferierenden Zellen wird während des Testzeitraums von zwei bis vier Tagen durch die Vermehrung der noch lebenden Zellen die Rate der abgestorbenen Zellen relativ vermindert (WEISENTHAL, 1981). Dadurch wird der Prozentsatz der toten Zellen falsch zu niedrig eingeschätzt.

5.1.2.3 Messung der primären Angriffspunkte von Zytostatika

Hierbei wird die Wirkung eines Arzneimittels auf ein bestimmtes Zellenzym oder einen metabolischen Weg in isolierten Tumorzellen gemessen; z.B. Asparagin-Synthese-Hemmung durch L-Asparaginase (HO, 1970), Inhibition der Dihydrofolsäure-Reduktase durch Methotrexat (HRYNIUK, 1969). Leider zeigten diese Tests in früheren Untersuchungen schlechte klinische Korrelationen (BENDER, 1976; SMYTH, 1976).

Es sind hier sehr komplexe und schwerfällige Testsysteme erforderlich. Arzneimittel, deren primäre Angriffspunkte

nicht genau bekannt sind, können nicht für den Test herangezogen werden. Beim Vorliegen mehrerer Angriffspunkte ist eine genaue Bestimmung nicht möglich (VON HOFF, 1980).

5.1.2.4 Messung der Inhibition des zellulären Metabolismus

Die zelluläre Dehydrogenaseaktivität wird hierbei durch die Reduktion von Methylenblau gemessen. DI PAOLO (1971) ließ Tumorzellen in Agar anwachsen und legte Zytostatikaplättchen auf. Gemessen wurde die Methylenblaufärbung und deren Reduktion in einer Zone um die Zytostatikaplättchen. Resistenzen wurden mit einer Sicherheit von nahezu 100 %, Sensibilität mit 50 % vorhergesagt.

Dieses System kann nicht zwischen verletzten Zellen, die sich wieder erholen können, und definitiv toten Zellen unterscheiden. Es wird außerdem sowohl der Metabolismus der Tumor-, der Normal- als auch der Stromazellen gemessen (VON HOFF, 1980; HAMBURGER, 1981).

5.1.2.5 Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen in DNS bzw. RNS

Tumorschnitte oder Tumorzellsuspensionen werden über verschieden lange Zeiträume (je nach Autor) mit Zytostatika und radioaktiv markierten Vorläufern der DNS-/RNS-Synthese in Nährlösung inkubiert (VOLM, 1970; WOLBER, 1971; LIVINGSTONE, 1980). Die Inhibition des Einbaus von H^3 -Thymidin bzw. 3H -Uridin in die DNS bzw. RNS wird gemessen. Hieraus kann man auf die Fähigkeit der Zytostatika zur Hemmung der DNS- bzw. RNS-Synthese schließen (VOLM, 1974). Dieser Test ist labortechnisch relativ einfach, es können Original-Tumorzellen ohne Anzüchtung verwendet werden. Es wurden hohe in-vitro-/Patientenkorrelationen bei gynäkologischen Tumoren festgestellt. Resistenz ist mit einer Treffsicherheit von 94 bis 96 %, Sensibilität in 45 bis 78 % der Fälle vor-

hersagbar (MATTERN, 1982). Es können fast alle Tumorarten getestet werden. Die Testergebnisse liegen innerhalb eines bis mehrerer Tage vor.

Nachteil beim Kurzzeittest (VOLM) sind die ungenügenden Einbauraten bei Zellen mit langer Zellzykluszeit. Der Zellzyklus wird wahrscheinlich für eine gewisse Zeit durch die Zellpräparation gestört. Veränderungen im Nukleosid-Transport und im Nukleosid-Pool könnten die Meßergebnisse verfälschen (HAMBURGER, 1981). Die Zellen treten nicht mehr in einen neuen Zellzyklus ein. Daher können nicht alle Medikamente (z.B. Mitosehemmstoffe) getestet werden (MATTERN, 1982). Einige dieser Probleme konnten in unserem modifizierten Testsystem (s.u.) gelöst werden.

5.1.2.6 Messung der Reproduktionsfähigkeit

Diesem System liegt das "Stammzellkonzept" zugrunde. Hier nach besteht der Tumor zum großen Teil aus Endzellen, die nach einer gewissen Zeit absterben. Stammzellen hingegen sind die Keimzelle der Zellvermehrung. Sie können sich selbst reproduzieren (STEEL, 1975). Tumorzellsuspensionen werden für eine Stunde mit Zytostatika inkubiert und nach Auswaschen auf Agarplatten ausgesät. Nach zwei bis drei Wochen Anzüchtungsdauer wird die Zahl der Stammzellkolonien mit der Kontrolle verglichen. Aus dem Verhältnis werden Schlüsse bezüglich der Effektivität des Zytostatikums gezogen. Die Angehrate (≥ 5 pro Kulturplatte/500 000 Zellen) beträgt ca. 66 %. Für eine gute Beurteilung des Ergebnisses werden 30 Kulturen/Kulturplatte für notwendig erachtet. Diese Zahl wird jedoch nur in 50 % der Kulturen erreicht (SALMON, 1978; HAMBURGER, 1978). Resistenz kann in 95 % der Fälle richtig vorausgesagt werden, Sensibilität in 64 % (SALMON, 1978).

Die Probleme dieses Tests liegen in einer geringen Platten-effizienz, einem großen Arbeitsaufwand und einer zwei- bis dreiwöchigen Dauer bis zum Testergebnis (VON HOFF, 1980). Die gebildeten Klonzellen mögen nicht repräsentativ für den Tumor sein (Selektion von Zellen) (MATTERN, 1982).

5.1.3 Auswahl des Testsystems

Bei der Auswahl eines geeigneten Testsystems für die Anwendung in unserem Labor ließen wir uns von den Forderungen von CLINE (1969) leiten. Er stellt folgende Forderungen an ein in-vitro-Testsystem:

1. Arzneimittel müssen in aktivierter Form zugegeben werden, oder sie müssen vom System aktiviert werden.
2. Der Zellmetabolismus muß in vitro/in vivo nahezu gleich sein, so daß die Arzneimittel-Effekte kompatibel sind.
3. Es muß eine ausreichend lange Zeit der Arzneimittel-einwirkung vorhanden sein.
4. Ein repräsentatives Tumorstück muß getestet werden.
5. Die Arzneimittel-Konzentration im Test muß realistisch für die patientengerechte Anwendung sein.
6. Der Test sollte nicht zu teuer, technisch einfach, schnell und reproduzierbar sein.
7. Eine strenge Korrelation zwischen den in-vitro-/in-vivo-Ergebnissen muß vorhanden sein.

Wir verwendeten zunächst den von VOLM entwickelten Kurzzeittest.

Von Nierenzellkarzinomen ist bekannt, daß sie meist langsam proliferieren. Dabei finden sich in den Randzonen und in Nekrosenähe wachstumsaktive Areale (SCHMIEDT, 1982).

Die Tumorverdoppelungszeit variiert beim Menschen zwischen sieben Tagen bei Grad 3 und ca. 50 Tagen bei Tumoren 1. Grades (RABES, 1979). In-vitro-Versuche ergaben bei einem Hypernephrom (Tu 252 C) eine Tumorverdoppelungszeit von 2,9 Tagen (= 70 Stunden) (BOLLEN, 1985).

Die Auswertung der ersten Tumoren ergaben unbefriedigende Ergebnisse. Bei der Betrachtung der Einbaukinetik zeigte sich keine Steigerung der Einbauraten gegenüber dem Ausgangswert. Auch hatten die getesteten Zytostatika keinerlei Einfluß auf den Thymidin- bzw. Uridineinbau. Dies war auf die folgenden testspezifischen Probleme zurückzuführen: Es ist bekannt, daß die Einbauraten in Zellen mit langen Zellzykluszeiten ungenügend sind (MATTERN, 1982). Da die Nierentumorzellen lange Zellzykluszeiten (ca. 72 Stunden) aufweisen, konnte kein Ansteigen der Einbauraten von Thymidin bzw. Uridin zwischen den einzelnen Abbruchzeiten (2, 4, 20, 40 und 60 Minuten) gemessen werden.

Im Vergleich zum VOLM-Assay wurden folgende Modifikationen durchgeführt:

- Veränderung der Inkubationszeiten
- Verwendung von 96-Loch-Platten
- Zellharvestung durch Atrypinisierung von der 96-Loch-Platte
- Verwendung von DMEM-Nährmedium
- Zellgewinnung durch kombinierte mechanische und enzymatische Methodik

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der Lektinergebnisse von KK-47-Zellen

RCA zeigte eine stark hemmende Wirkung auf die KK-47-Zellen. Bei der Betrachtung der Dosiswirkkurve fällt auf, daß schon bei relativ geringen Konzentrationen relativ hohe Inhibitionen zustandekommen. Danach tritt ein gewisses Plateau auf. Die Peroxidasefärbung zeigt, daß *RCA*-Rezeptoren an dieser Zelllinie vorhanden sind. Das Plateau deutet darauf hin, daß nach Sättigung der Rezeptoren mit *RCA* kein größerer zytotoxischer Effekt mehr möglich ist. Dies entspricht auch dem postulierten Wirkungsmechanismus (s. Charakterisierung). *RCA* erweist sich somit als eine stark zytotoxisch wirkende Substanz, die, wie bereits erwähnt, auch schon therapeutisch eingesetzt wurde (OLSNES, 1975; OLSNES, 1976; LIN, 1970; HSU, 1974). Für die Behandlung des Blasenkarzinoms durch Instillation oder systemische Gabe ergeben sich somit neue Perspektiven.

Im Vergleich zu *RCA* senkt *APA* den Thymidin- und Uridineinbau in geringerem Maße. Auch hier fällt die Sättigung der zytolytischen Wirkung bei Gabe höherer Dosen auf. Dieses Phänomen stimmt auch mit dem Ergebnis von Bindungsversuchen überein, die eine quantitative Sättigung der Toxinbindung an die Zellen feststellten (OLSNES, 1976). *RCA* und *APA* zeigen ähnliche Wirkungen auf die Proteinbiosynthese.

Die bei niedrigen Konzentrationen auftretende Stimulierung des Uridineinbaus durch *WGA* wird beim Hypernephrom diskutiert. Sowohl in der Literatur (BECHT, 1984) als auch bei eigenen Peroxidaseversuchen konnte eine Bindung an die Blasenkarzinomzellen festgestellt werden. In der Literatur ist die Fähigkeit von *WGA* beschrieben, transformierte Zellen agglutinieren und lysieren zu können (AUB, 1963; BURGER, 1972). Diese Tatsache konnte auch in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden.

Auch hier ist zu beobachten, daß bei einer Steigerung der WGA-Konzentrationen nach Erreichen einer maximalen Inhibition die Minderung des Thymidineinbaus rückläufig ist; beim Uridineinbau wird ein Plateau erreicht. Dies deutet darauf hin, daß bei einer gewissen Konzentration alle Bindungsstellen abgesättigt und die zytolytische Potenz ausgeschöpft ist.

CON A zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie WGA. Die stimulierenden Effekte bei niedrigen Konzentrationen sind hier jedoch stärker ausgeprägt. Auch hier konnten Zellagglutinationen, wie bereits bei WGA beschrieben, gesehen werden (BURGER, 1972; AUB, 1963).

Lektin-Peroxidasefärbungen ergaben eine Anfärbbbarkeit des Tumorgewebes. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen fand sich eine steigende Anzahl von Bindungsstellen, proportional zum Tumorgrad (TAKAYAMA, 1984). Da es sich hier um einen Grad 1-Tumor handelt, dürfte quantitativ keine sehr große Anzahl von Bindungsstellen vorliegen. Dies erklärt auch die nicht übermäßig stark ausgeprägte inhibitorische Wirkung von CON A bei der untersuchten Tumorzelllinie.

Da CON A wie METHOTREXAT die de-novo-Synthese beeinflusst (CHOWDHURY, 1974), wäre die Steigerung des Thymidin- bzw. Uridineinbaus bei niedrigen Konzentrationen über denselben Mechanismus denkbar.

Der fehlende Einfluß von SBA auf den Thymidin- und Uridineinbau kann mit dem im Peroxidaseversuch fehlenden Bindungsverhalten erklärt werden.

Von PNA ist bekannt, daß bei steigender Ausdifferenzierung des Tumors die Rezeptoren verloren gehen (REISNER, 1977; BECHT, 1984) bzw. nur maskiert vorliegen. Die bei hohen Konzentrationen auftretende exponentielle Thymidinsynthese-

steigerung ist wahrscheinlich auf die Beeinflussung der de-novo-Synthese durch PNA-Rezeptor-Bindungen bei sehr hohem PNA-Angebot zurückzuführen. Der Peroxidasebindungsversuch ergab lediglich eine geringfügige Anfärbung der KK-47-Zelllinie.

5.2.1.1 Diskussion der Zuckerhemmungsversuche mit Lektinen

Die Vorversuche unter alleiniger Verwendung von Zuckern bestätigten die bekannte Tatsache, daß die Zellmembranen bei zu hohem osmotischem Druck lysieren. Deshalb wurden Zuckerkonzentrationen ausgewählt, die möglichst geringe Auswirkungen auf die normale Zellproliferation zeigten.

Erwartungsgemäß vermag *Mannose* die Inhibition durch CON A aufzuheben.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von RCA und APA fällt auf, daß *Galaktose* die starke inhibitorische Wirkung nur in geringem Maße oder kaum aufhebt. Auch von RALPH wird berichtet, daß die starke zytolytische Wirkung von RCA nicht vollständig zu beseitigen ist (RALPH, 1973). Es ist anzunehmen, daß die toxische Wirkung der Lektine wahrscheinlich zu stark und die Affinität zu ihren Rezeptoren größer als die des Zuckers Galaktose ist.

Bei der Betrachtung der stimulierenden Wirkung von PNA zeigt sich, daß Galaktose die Stimulierung in gewissem Ausmaß herabsetzt. Galaktose scheint hier PNA als Konkurrenten teilweise vom Rezeptor fernhalten zu können.

NAc-Glc zeigt beim Inhibierungsversuch mit WGA folgende Effekte: Über die Inhibition hinaus führt es zu einer Steigerung des Thymidineinbaus. Man kann daraus schließen, daß *NAc-Glc* wahrscheinlich eine stärkere Affinität zum Rezeptor hat als WGA. Auch bei alleiniger Gabe von *NAc-Glc* können Steigerungen der Thymidinsynthese beobachtet werden.

Dies deutet darauf hin, daß sich die Proliferationseigenschaften im Milieu verbessert haben bzw. Einfluß auf die de-novo-Synthese genommen wurde.

5.2.2 Diskussion der Einflüsse von Zytostatika auf KK-47-Zellen

5.2.2.1 ADRIBLASTIN^R

Das aus der Literatur bekanntermaßen beim Blasenkarzinom stark wirksame ADM zeigte auch bei den KK-47-Zellen den erwarteten Erfolg (ENGELMANN, 1981). Die Dosis-Wirkungskurve wies eine dosisabhängige Verlaufsform auf. Die stärkere Inhibition des Thymidineinbaus läßt sich mit dem Wirkungsmechanismus von ADM erklären, der auf einer Interkalkation an die DNS-Doppelhelix beruht (s. Charakterisierung von ADM).

5.2.2.2 ELDISINE^R

Bei ELDISINE^R hingegen stellte sich eine deutlich geringere Hemmung heraus, was mit dem Angriffspunkt in der Mitosephase zu erklären ist (s. Abb. 20 und 21).

5.2.2.3 PLATINEX^R

PLATINEX^R zeigte bei einer Hemmung von 15 % keine signifikante zytostatische Aktivität (s. Abb. 20 und 21).

5.2.2.4 MITOMYCIN^R

MITOMYCIN^R hemmte - ähnlich wie ELDISINE^R - die Einbau-raten um ca. 40 % (s. Abb. 20 und 21).

5.2.2.5 CHLAMYDOCIN

CHLAMYDOCIN wurde in der Literatur als potentes Zytostatikum beschrieben (s. Charakterisierung; STÄHELIN, 1974). In der verwendeten Blasenkarzinom-Zelllinie war es in der Lage, den Uridin- und Thymidineinbau um 76 % zu hemmen. Der beschriebene Verlust der Fähigkeit, bei steigenden Konzentrationen immer größere Inhibitionen herbeizuführen, konnte auch hier in dem 20-%-FCS-haltigen Ansatz gesehen werden.

Aufgrund der in der Literatur angegebenen Aktivitätsminderung durch Zugabe von Serum wurden Versuche mit 10-%- bzw. 20-%-haltigem Medium durchgeführt (STÄHELIN, 1974). Dabei trat der beschriebene Effekt bei 20-%-FCS-haltigem Medium stärker zu Tage als bei 10%igem.

Es fällt auf, daß die 20-%-Lösung bei niedrigeren Dosen eine bessere inhibierende Potenz aufweist als die 10-%-Lösung. Bei der höchsten verwendeten Konzentration hingegen inhibierte die 10-%-Lösung stärker. Der für eine gute Wirkung geforderte lange Zell-/Wirkstoffkontakt wurde hier erfüllt.

5.2.3 Diskussion der Einflüsse von Lektinen auf die Hypernephromzellen

Der Wirkungsmechanismus der Lektine wurde bereits in der Einleitung dargestellt.

Unser Ergebnis, daß RCA II sich stärker inhibierend auf die Hypernephromzellen als auf die Normalzellen auswirkt, wird durch Versuche mit Rattenleberzellen und menschlichen Leberzellen bestätigt. An transformierten Rattenleberzellen konnte gezeigt werden, daß dort im Gegensatz zu normalen Rattenleberzellen eine positive MikrohämadSORPTION nachzuweisen ist (ROTH, 1975). An menschlichen Leberzellen konnte gezeigt werden, daß die Proteinsynthese erheblich resistenter gegenüber RCA ist als beim YOSHIDA ascites hepatom (LIN, 1971).

Bei den oben beschriebenen Peroxidaseversuchen am Hypernephrom zeigte sich eine große Vielgestaltigkeit der Lokalisation der RCA-Rezeptoren. Es wird angenommen, daß Tumoren mehr "Rezeptoren" besitzen bzw. exprimieren als normale Zellen (YAWATA, 1983).

Im klinischen Gebrauch konnten mit APA und RCA bei fortgeschrittenen Fällen von Epidermoid-Karzinomen, Adenokarzinomen und Sarkomen eine Stabilisierung von nahezu drei Jahren erreicht werden. Das hämatopoetische System, Nieren- und Leberfunktion wurden nicht wesentlich beeinträchtigt (HSU, 1974).

Die bei niedrigen Konzentrationen auftretende stimulierende Wirkung der Lektine WGA und CON A deckt sich mit Berichten aus der Literatur, die CON A als potentes Mitogen bei einer Konzentration von 3 µg/ml ansehen (GUNTHER, 1973). Die Stimulation konnte durch autoradiographische Methoden nachgewiesen werden (GUNTHER, 1974). Außerdem muß auch auf die Einwirkung auf die de-novo-Synthese hingewiesen werden.

In der Einleitung wurde bereits auf die Bindung der beiden Lektine an normale Nierenzellen und an Hypernephromen aufmerksam gemacht. Der zytolytische Effekt von WGA in höheren Konzentrationen an murinen Tumoren konnte hervorgehoben werden. (ESUMI-KURISU, 1983). Die bei höheren Konzentrationen auftretende Inhibition entspricht der Vorstellung, daß CON A und WGA bei größerer Möglichkeit und Wahrscheinlichkeit an die Tumorzellrezeptoren zu binden, mehr zytolytische Aktivität entfalten können.

Im Vergleich zu den getesteten Zytostatika und der klinischen Erfahrung (LIEBER, 1981; LIEBER, 1984; FLEISCHMANN, 1983), daß das hypernephroide Nierenzellkarzinom ein für die Chemotherapie fast immer refraktärer Tumor ist, haben die Lektine bessere inhibitorische Wirkungen entfaltet. Dabei wies RCA einen stärker hemmenden Effekt als die anderen beiden verwendeten Lektine auf.

Von Interesse wären weitergehende Forschungen dieser Substanzen im Tiermodell auf ihre Wirkungen und Nebenwirkungen am Hypernephrom zu untersuchen.

5.2.4 Diskussion der Einflüsse von Zytostatika auf die Hypernephromzellen

Die an zehn Patiententumoren durchgeführten Versuche mit der Methode nach VOLM erbrachten unzulängliche Ergebnisse. ADRIBLASTIN^R und ENDOXAN^R vermochten die Einbaurrate lediglich um 10 % zu senken. Diese unbefriedigenden Ergebnisse veranlaßten ein Überdenken der Methodik und eine Modifikation in der oben angegebenen Weise.

Bei den Überlegungen gingen wir von der Tatsache aus, daß es sich beim hypernephroiden Karzinom um einen sehr langsam wachsenden Tumor handelt. Auch von SEEBER wird auf das Problem der zu kurzen Versuchszeiten hingewiesen (SEEBER, 1977).

Die aufgrund dieser Tatsache durchgeführten Kinetikversuche ergaben die optimale Inkubationszeit von 70 bis 80 Stunden. Unsere Ergebnisse mit den Zytostatika sind ein weiterer Beleg, daß das Hypernephrom für die Chemotherapie bis jetzt noch sehr schwer zugänglich ist. Die Frage, ab wann ein Tumor in vitro als "sensibel" oder "resistent" gegenüber einem Zytostatikum einzustufen ist, wird in der Literatur unterschiedlich beantwortet. VOLM et al. sehen einen Tumor, der durch ADM in ihrem Assay um mehr als 30 % in seinem Wachstum gehemmt wird, als "sensibel" an und behandeln die Patienten dementsprechend. KURTH definiert eine 70%ige Einbauhemmung als Grenze zwischen "sensibel" und "resistent" (KURTH, 1985). Da die Festlegung von Grenzen willkürlich geschieht, ist eine eindeutige Beantwortung der Frage bis jetzt nicht möglich. Auch die Höhe der Dosierung der Zytostatika in den verschiedenen Testsystemen wird unterschiedlich beurteilt. In ihrem "soft aggar Kolonietest" verwenden LIEBER et al. 10fach höhere Dosen,

als im Plasma erreichbar; dafür werden die Zellen nur für eine Stunde dem Zytostatikum exponiert (LIEBER, 1981).

Unsere Versuche wurden mit niedrigeren Zytostatikakonzentrationen durchgeführt, dafür die Zellen aber von Beginn an exponiert.

Resistenzen sind bei kurzer Testdauer gut nachweisbar, verglichen mit den wochenlang dauernden in-vivo- bzw. Stammzellassays. Seine Grenzen findet der Test durch die alleinige Verwendbarkeit schon aktivierter Substanzen. Das Ausmaß der Sensibilität ist im Test nicht sicher vorhersagbar. Es können nur Aussagen über die Möglichkeit der Resistenz bzw. der Sensibilität gemacht werden. Aus der Betrachtung der Einbauraten von Thymidin und Uridin allein können keine Aussagen über verbleibende Zellen gemacht werden, die die spätere Fähigkeit zur Proliferation behalten haben, da ihr Kernstoffwechsel zu diesem Zeitpunkt inaktiv ist.

Pharmakokinetische Faktoren, intrazelluläre Aufnahme und Retention sowie zytostatische Wechsel- und Spätwirkungen sind in vitro nicht vollständig untersuchbar (SEEBER, 1977). Diese Faktoren müssen weiterhin in vivo oder mit anderen pharmakologischen Methoden geprüft werden.

Bei den vorliegenden Fallzahlen und der Verwendung von drei wells pro verwendeter Konzentration der eingesetzten Testsubstanzen war die Anwendung gängiger, sinnvoller statistischer Testverfahren nicht möglich. Um dennoch eine Möglichkeit des Vergleichs zu bekommen, wurden die Meßwerte graphisch als Prozentsatz der Kontrollwerte in Abhängigkeit der Konzentrationen der Testsubstanzen dargestellt.

5.3 Schlußfolgerungen und Ausblick

Es konnte eine modifizierte in-vitro-Methode gefunden werden, um Zytostatika und Lektine an Nierentumoren und der Blasen-tumorzelllinie KK-47 zu testen. Mit der Methodik der Kurzzeitzellkultivierung wurde der tumorbiologischen Tatsache des langsamen Wachstums dieser Tumoren Rechnung getragen. Vorteilhaft ist, daß ohne Tierversuche Aussagen über die individuelle Sensibilität eines Tumors möglich sind und damit eine klinische Relevanz denkbar erscheint.

Diese Methode war anwendbar bei einer permanenten Blasen-tumorzelllinie und konnte gut auf frisches Tumormaterial von Patienten übertragen werden. Ein Dilemma beim hypernephroiden Nierenkarzinom bleibt, daß alle Überwiegend getesteten Substanzen kaum Wirkungen gezeigt haben. Nur einzelne Tumoren zeigten ein Ansprechen in vitro. In vivo könnte eine individuelle Therapie von Metastasen möglich werden.

Im Gegensatz zu den getesteten Zytostatika wirkten Lektine in unserem Versuchsansatz als sehr potente Hemmstoffe des Zellwachstums. Dies ist umso mehr von Bedeutung, als Lektine im Tier- und Pflanzenreich Einfluß auf die Gewebsdifferenzierung von Wirbeltieren, das Größenwachstum und die antimikrobielle Ak-Bildung haben. Unsere Versuche unterstützen die Bestrebungen, neue antitumorale Substanzen zu finden. Von besonderer Bedeutung könnten Lektine für das Blasenkarzinom sein, da in histochemischen Untersuchungen eine Affinität der Lektine zu Karzinomzellen gezeigt wurde (BECHT, 1984). Zudem besteht beim Blasenkarzinom die einmalige Möglichkeit einer nicht systemischen Anwendung durch Instillation.

Beim hypernephroiden Nierenkarzinom scheinen die Lektine eine der wenigen Substanzen zu sein, die bei diesem Tumor hemmend wirken. Durch die Kombination von Tumorantikörpern mit Lektinen ("Immuntoxine") könnte sich in der Zukunft bei diesem Tumor ein Therapieweg anbieten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Nach unbefriedigenden Ergebnissen mit einem von VOLM entwickelten Kurzzeitprecursorassay (vier Stunden) wurde ein zur Testung von antitumoralen Substanzen modifizierter Test entwickelt, der den Vorteil hat, auf langsam wachsende Tumoren anwendbar zu sein.

Der Einfluß der Lektine Concanavalin A (CON A), Wheat germ (WGA), Ricinus communis (RCA), Soybean (SBA), Abrus praecatorius (APA), Peanut (PNA) sowie der Zytostatika ADRIBLASTIN^R, ELDISINE^R, MITOMYCIN^R, PLATINEX^R und CHLAMYDOCIN auf den Thymidin- und Uridineinbau an der Blasenkarzinomzelllinie KK-47 wurde studiert. Außerdem wurde die Fähigkeit, die Lektineinwirkung durch ihre spezifischen Zucker zu inhibieren, untersucht.

Bei der KK-47-Zelllinie zeigten die Lektine RCA, WGA, CON A, APA und PNA sowie die Zytostatika ADRIBLASTIN^R, ELDISINE^R und CHLAMYDOCIN unterschiedlich starke, dosisabhängige, inhibierende Wirkungen. Die hemmende Wirkung der Lektine CON A und WGA konnte vollständig, von RCA teilweise durch die spezifischen Zucker aufgehoben werden.

Ferner wurden die Wirkungen der Lektine Concanavalin A (CON A), Wheat germ (WGA) und Ricinus communis (RCA) sowie der Zytostatika MITOMYCIN^R, ADRIBLASTIN^R, ELDISINE^R und PLATINEX^R auf den Thymidin- und Uridineinbau an hypernephroiden Nierenzellkarzinomen und Nierennormalgewebe untersucht.

RCA zeigte beim Hypernephrom eine dosisabhängige bis zu 60%ige Hemmung des Uridin- und 40%ige Reduktion des Thymidineinbaus. Dabei wurden auch die Normalzellen in ähnlicher Weise, jedoch nicht so stark gehemmt.

CON A und WGA zeigten in 60 % der Fälle bei niedrigen Konzentrationen stimulierende Wirkungen, um bei höheren Konzentrationen hemmend zu wirken. Bei 30 % der Tumoren wurden nur inhibierende Wirkungen beobachtet.

Die Ergebnisse der verwendeten Zytostatika bestätigen die in der Literatur und Klinik bekannte Tatsache, daß das hypernephroide Nierenzellkarzinom gegen Zytostatika praktisch resistent ist.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Achterrath, W., Maier-Lenz, H., Hackmann, R.:
 PLATINEX^R (INN: Cisplatin) Chemotherapeutikum für Mono-
 und Polychemotherapie maligner Neoplasien.
 In: Produktinformation Bristol-Meyers GmbH, Neu-Isenburg,
 7/1979.

ADRIBLASTIN^R-Produktinformation:
 In: Hrg. Farmitalia Carlo Erba GmbH, Freiburg i. Br.

Akaza, H. et al.:
 Experimental intravesical treatment of bladder tumor with
 Con A conjugated Bleomycin. In: Jpn. J. Urol. 75 (1984),
 S. 211-214.

Alberto, P., Senn, H.J.:
 Hormonal therapy of renal carcinoma alone and in association
 with cytostatic drugs. In: Cancer 33 (1974), S. 1226 ff.

Allen, A.K., Neuberger, A., Sharon, N.:
 The purification, composition and specificity of wheatgerm
 agglutinin. In: Biochem J. 131 (1973), S. 155-162.

Aub, J.C., Tieslau, C., Lankester, A.:
 Reactions of normal and tumor cell surface to enzymes. I.
 wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides.
 In: Proc. nat. Acad. Sci USA 50 (1963), S. 613-619.

Barondes, S.H.:
 Lectins: their multiple endogenous cellular functions.
 In: Ann. Rev. Biochem. 50 (1981), S. 207-231.

Basu, S.:
 Biomedical use of Ricin A and B chains.
 In: Biotechs, Winter 83-1.

Bateman, A.E., Selby, P.J., Stee, G.G. et al.:
 In vitro chemosensitivity tests on xenografted human
 melanoms. In: Br. J. Cancer 41 (1980), S. 189-198.

Bauer, H.W. et al.:

Mitomycin C-Ergebnisse bei Harnblasentumoren.

In: Tumor, Diagnostik und Ther. 5 (1984), S. 1-38.

Becht, E., Schärfe, T., Thüroff, J.W., Hohenfellner, R.:

Lectinreceptors as biological markers of differentiation in bladder carcinoma. In: Proc. 79. AUA meet., New Orleans, 1984.

Beckert, W.H., Sharkey, M.M. Sr.:

Mitogenic activity of the Jackbean (Concanavalina ensiformis) with rabbit peripheral blood lymphocytes.

In: Arch. Allergy App. Immunol. 39 (1970), S. 337-341.

Bender, R.A., Gieger, W.A., Drake, J.C. et al.:

In vitro correlates of clinical response to Methotrexate in acute leucaemia and Burkitt's lymphoma.

In: Br. J. Cancer 34 (1976), S. 484-492.

Bender, R.A., Chabner, B.A.:

Tubulin binding agents. In: Hrg. Chabner, B.:

Pharmacologic principles of cancer treatment, W.B. Saunders Comp. Philadelphia, London, Toronto 1982.

Berenbaum, M.C.:

Predicting-response of human cancer to chemotherapy.

In: Lancet 9 (1974), S. 1141-1142.

Bogden, A.E., Cobb, W.R., Lepage, D.J. et al.:

Chemotherapy responsiveness of human tumors as first transplant generation xenografts in the normal mouse.

In: Cancer 48 (1981), S. 10-20.

Bhuyan, B.K. Longham, B.E., Fraser, T.J. et al.:

Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds.

In: Exp. Cell Res. 97 (1976), S. 275-280.

Blum, R.H., Carter, S.K.:

Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. In: Ann. intern. Med. 80 (1974), S. 249-259.

Bollen, M.:

Cytolytische und cytogenetische Untersuchungen nach biologischen Markern bei Nierenzellkarzinomen. Med. Diss. Universität Mainz, 1985.

Bouffieux, Cr.R.A.:

Epidemiology of bladder cancer. In: Bladder Cancer, Part A: Pathology, diagnosis and surgery. Hrg. Küss, R., Khoury, S., Denis, L.J., Liss New York, 1984, S. 11-25.

Brade, W.P.:

Critical review of pharmacology, toxicology, pharmacokinetics of vincristine, vindesine, vinblastine. In: Proc. of internat. vinca alkaloid symp. vindesine, Frankfurt (1981), S. 95-123.

Bretton, R., Bariety, J.:

A comparative ultrastructural localisation of Concanavalin A, WGA and RCA in glomeruli of normal rat kidney. In: J. Histochem. Cytochem. 24 (1976), S. 1093-1100.

Burger, M.M., Goldberg, A.R.:

Identification of a tumor specific determinant on neoplastic cell surfaces. In: Proc. nat. Acad. Sci. USA 57 (1967), S. 359-366.

Burger, M.M., Noonan, K.D.:

Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumor cell surface. In: Nature 228 (1970), S. 512-515.

Burger, M.M., Martin G.S.:

Agglutination of cells transformed by Rous sarcoma virus by Wheat germ agglutinin and Concanavalin A.

In: Nature 237 (1972), S. 9-12.

Camphell, A.B., Kalman, S.M., Jacobs, C.:

Plasma platinum levels: relationship to Cisplatin dose and nephrotoxicity. In: Cancer Treatm. Rep. (Bethesda) 67 (1983), S. 169-171.

Cersosimo, R.J., Bromer, R., Licciardello, J.T.W. et al.:

Pharmacology, clinical efficacy and adverse effects of Vindesine sulfate, a new vinca alkaloid.

In: Pharmacotherapy 3 (1983), S. 259-274.

Chowdhury, T., Chou, A.C.:

Some electrical properties of chemically induced tumor cells. In: J. nat. Cancer Inst. 51 (1973), S. 1981-1982.

Chowdhury, T.K., Weiss, A.K.:

Effects of Concanavalin A on cellular dynamics and membrane transport. Plenum Press New York, London, 1974.

Cline, M.:

In vitro test systems for anti-cancer drugs.

In: N. Engl. J. Med. 280 (1969), S. 955 ff.

Closse, A., Huguenin, R.:

Isolierung und Strukturaufklärung von Chlamydocin.

In: Helv. chim. Acta 57 (1974), S. 533-545.

Dendy, P.O., Bozman, G., Wheeler, T.K.:

In vitro screening test for human malignant tumors before chemotherapy. In: Lancet 2 (1970), S. 68-72.

Di Marco, A.:

Adriamycin (NSC-123127): mode mechanism of action.

In: Cancer Chemother. Rep. 6 (1975), S. 91-106.

Di Paolo, J.A.:

Analysis of an individual chemotherapy assay system.

In: Natl. Cancer Inst. Monogr. 34 (1971), S. 240-245.

Drewinko, B., Patchen, M., Yang, L.Y. et al.:

Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells.

In: Cancer Res. 41 (1981), S. 2328-2333.

Droller, M.J.:

Immunotherapy in genitourinary neoplasia.

In: J. Urol. 133 (1985), S. 1-5.

Drysdale, R.G., Herrick, P.R., Franks, D.:

The specificity of the hemagglutinin of the castor bean.

Ricinus communis. In: Vox. Sang. 15 (1968), S. 194-202.

Ducore, J.M., Erickson, L.C., Zwellung, L.A. et al.:

Comparative studies of DNA-cross-linking and cytotoxicity in Burkitt's lymphoma cell lines treated with cis-Diamminedichloroplatinum (II) and L-Phenylalanine mustard.

In: Cancer Res. 42 (1982), S. 987 ff.

Edelman, G.M., Cunningham, B.A., Reeke, G.N. et al.:

The covalent and threedimensional structure of Concavalin A. In: Proc. nat. Acad. Sci. USA 69 (1972),

S. 2580-2584.

Eksborg, S., Nilsson, S.O., Edsmyr, R.:

Intravesical instillation of Adriamycin: a model for the standardisation of chemotherapy. In: Europ. Urol. 6

(1980), S. 218-220.

Engelman, U., Thüroff, J., Frohneberg, D. et al.:

Wirkung von Adriamycin, Mitomycin C und VM-26 bei der intravesicalen Instillations-Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms. In: Beitr. Onkol. 9,

Karger Basel, 1981, S. 312-313.

Esumi-Kurisu, M., Iwata-Dohi, N., Mizuno, D. et al.:
Inhibition of murine tumor development by the lectin
Wheat germ agglutinin. In: Gann 74 (1983), S. 398-404.

Faraggiana, T., Malchiodi, F., Prado, A. et al.:
Lectin-peroxidase conjugate reactivity in normal human
kidney. In: J. Histochem. Cytochem. 30 (1982), S. 451-458.

Fleischmann, J., Heston, W.D.W., Fair, W.R.:
Renal cell carcinoma and the clonogenic assay.
In: J. Urol. 130 (1983), S. 1060-1062.

Flüchter, S.H., Hlobil, H., Harzmann, R. et al.:
Serum- und Gewebe-Mitomycin-C-Spiegel nach intravesikaler
Instillation. In: Urol. int. 38 (1983), S. 321-328.

Hardman, K.D., Ainsworth, C.F.:
Binding of nonpolar molecules by crystalline Concanavalin A.
In: Biochemistry 12 (1973), S. 4442-4448.

Heaney, J., Ucci, A., Gravis, V. et al.:
Lectin receptors in normal and neoplastic urothelium.
In: Proc. 79. AUA meeting New Orleans, 1984.

Heckmann, U.:
Neue Möglichkeiten einer Resistenzprüfung menschlicher
Karzinomgewebe gegen Zytostatika im in vivo-Test.
In: Dtsch. med. Wschr. 92 (1967), S. 932-935.

Hermanek, P., Sigel, A., Chlepas, S.:
Histological grading of renal cell carcinoma.
In: Europ. Urol. 2 (1976), S. 189-191.

Hill, B.J., Whelan, R.D.H.:
Comparative cell killing and kinetic effects of vincristine
or vindesine in mammalian cell lines.
In: J. nat. Cancer Inst. 67 (1981), S. 437-443.

Hisazumi, H., Kanogoki, M., Nakajima, K. et al.:
Established cell line of urinary bladder carcinoma
(KK-47): growth, heterotransplantation, microscopic
structure and chromosome pattern.

In: Jap. J. Urol. 70 (1979), S. 485-494.

Ho, D., Whitecar, J., Luce, J.K., Fuei, E.:
L-asparagine requirement and the effect of L-asparaginase
on the normal and leucemic human bone marrow.

In: Cancer Res. 30(1970), S. 466-472.

Hoff von, D.D. et al.:

Toxic effects of cis-Dichlordiammineplatinum (II) in man.

In: Cancer Treatm. Rep. (Bethesda) 63 (1979), S. 1527-1531.

Hoff, von, D.D., Weisenthal, L.M.:

In vitro methods to predict for patient response to chemo-
therapy. In: Advanc. Pharmacol. Chemother. 17 (1980),
S. 133-156.

Fujita, H.:

Comparative studies on the blood level, tissue distribu-
tion, excretion and inactivation of anticancer drugs.

In: Jap. J. clin. Oncol. 12 (1971), S. 151-162.

Gensheimer, G.G., Neefe, J.R.:

Cell-mediated lympholysis: a receptor-associated lytic
mechanism. In: Cell. Immunol. 36 (1978), S. 54-64.

Goldberg, D.M., Witte, S.:

Chemotherapy of morphologically similar human tumors
growing in the cheek pouch of the golden hamster:

H. Ad. No. 1 and Gw-39. In: Europ. J. Cancer 3 (1967),
S. 95 ff.

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M. et al.:

What should be called a lectin? In: Nature 285 (1980), S. 66.

Gordon, J.A., Marquardt, M.D.:

Factors affecting hemagglutination by Concanavalin A and soy bean agglutinin. In: Biochim. biophys. Acta 332 (1974), S. 136-144.

Gürtler, L.G., Horstmann, H.J.:

Subunits of toxin and agglutinin from ricinus communis. In: Biochim. biophys. Acta 295 (1973), S. 582-594.

Gunther, G.R., Wang, J.L., Yahara, J. et al.:

Concanavalin A derivatives with altered biological activities. In: Proc. nat. Acad. Sci. USA 70 (1973), S. 1012-1016.

Gunther, G.R., Wang, J.L., Edelman, G.M.:

The kinetics of cellular commitment during stimulation of lymphocytes by lectins.

In: J. Cell Biol. 62 (1974), S. 366-377.

Hamburger, A.W.:

Use of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. In: J. nat. Cancer Inst. 66 (1981), S. 981-988.

Holthöfer, H., Virtanen, I., Pettersson, E. et al.:

Lectins as fluorescence microscopic markers for saccharides in the human kidney. In: Lab. Invest. 45 (1981), S. 391-399.

Holthöfer, H., Miettinen, A., Paasivuo, R. et al.:

Cellular origin and differentiation of renal carcinomas. A fluorescence microscopic study with kidney-specific antibodies, antiintermediate filament antibodies and lectins. In: Lab. Invest. 49 (1983), S. 317-326.

Holthöfer, H.:

Lectin binding sites in kidney. A comparative study of 14 animal species. In: J. Histochem. Cytochem. 31 (1983), S. 531-537.

Hrushesky, W.J., Murphy, G.P.:

Current status of the therapy of advanced renal carcinoma.

In: J. Surg. Oncol. 9 (1977), S. 277-288.

Hrynink, W., Bertino, J.:

Treatment of leucemia with large dosis of Methotrexate and folinic acid: clinical-biochemical correlates.

In: J. clin. Invest. 48 (1969), S. 2140-2155.

Hsu, C.T., Lin, J.Y., Tung, T.C.:

Further report on therapeutic effect of abrin and ricin on human cancers. In: J. Formos. med. Ass. 73 (1974),

S. 526-542.

Huland, H.W., Otto, U.:

Mitomycin - Blaseninstillation zur Rezidivprophylaxe oberflächlicher Blasenkarzinome. In: Urologe B 23 (1983), S. 326-327.

Huland, H., Otto, U., Droese, M. et al.:

Long-term Mitomycin C instillation after transurethral resection of superficial bladder carcinoma: Influence on recurrence, progression and survival.

In: J. Urol. 132 (1984), S. 27-29.

Inbar, M., Sachs, L.:

Interaction of the carbohydrate-binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells.

In: Biochemistry 63(1969), S. 1418-1425.

Inbar, M., Sachs, L.:

Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells.

In: Nature 223 (1969), S. 710-712.

Inbar, M., Ben-Bassat, H., Sachs, L.:

Location of amino acid and carbohydrate transport sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. In: J. Membr. Biol. 6 (1971), S. 195-209.

Inbar, M., Ben-Bassat, H., Sachs, L.:

Inhibition of ascites tumor development by Concanavalin A. In: Int. J. Cancer 9 (1972), S. 143-149.

Jacobi, G.H.:

Klassifikation urologischer Tumoren: Das TNM-System. In: Urologie in Klinik und Praxis Band I. Hrg. Hohenfellner, R., Zingg, E.J., Thieme Stuttgart, 1982, S. 696-699.

Khandekar, J.D. et al.:

Cis-Platinum in bladder cancer. In: Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol. 3 (1983), S. 143.

Kimler, B.F., Schneiderman, M.H., Leeper, D.B.:

Induction of concentration-dependent blockade in the G₂-phase of the cell cycle by cancer chemotherapeutic agents. In: Cancer Res. 38 (1978), S. 809-814.

Kitao, T., Hattori, K.:

Concanavalin A as a carrier of Daunomycin. In: Nature 265 (1977), S. 81-82.

Koizumi, H.:

Chemosensitivity of KK-47 bladder cancer cells and KN-41 renal cancer cells heterotransplanted in nude mice. In: Jap. J. Urol. 74 (1983), S. 704-718.

Kurisu, M., Yamazaki, M., Mizuno D.:

Induction of macrophage-mediated tumor lysis by the lectin Wheat germ. In: Cancer Res. 40 (1980), S. 3798-3803.

Kurth, K.H., Weissglas, G.M., Romijn, J.C. et al.:
Chemotherapie des Nierenkarzinoms in vitro und in vivo
im Modellsystem nackte Maus.

In: Akt. Urol. 14 (1983), S. 223-229.

Kurth, K.H., Dongen van, J.W., Romijn, J.C. et al.:
Assay evaluability of drug testing systems determined
with human renal carcinoma cell lines.

In: World J. Urol. 2 (1984), S. 146-155.

Kurth, K.H.:

Charakterisierung und Behandlung humaner Nierentumor-
Linien. Med. Habil.-Schr. Universität Mainz, 1985.

Le Hir, M., Kaissling, B., Koeppen, B.M. et al.:

Binding of peanut lectin to specific epithelial cell types
in kidney. In: Amer. J. Physiol. 242 (1982), S. 117-120.

Lickiss, J.N., Cane, K.A., Baikie, A.G.:

In vitro drug selection in antineoplastic chemotherapy.

In: Europ. J. Cancer 10 (1974), S. 809-814.

Lieber, M.M.:

Soft agar colony formation assay for in vitro chemothera-
py sensitivity testing of human renal cell carcinoma:

Mayo clinic experience. In: J. Urol. 131 (1984), S. 391-393.

Lieber, M.M., Kovach, J.S.:

Soft agar clonogenic assay for primary human renal carcinoma:
in vitro chemotherapy drug sensitivity testing.

In: Invest. Urol. 19 (1981), S. 111-114.

Liener, I.E.:

Inactivation studies on the soybean hemagglutinin.

In: J. Biol. Chem. 233 (1958), S. 401-405.

Lin, H., Bruce, W.R., Walcroft, M.J.:

Concanavalin A (NSC-143504): Its action on experimental tumor cells and possible use in cancer chemotherapy.

In: Cancer Chemother. Rep. 59 (1975), S. 319-326.

Lin, J.Y., Tsering, K.Y., Chen, C.C. et al.:

Abrin and ricin: new antitumor substances.

In: Nature 227 (1970), S. 292-293.

Lin, J.Y., Lin, K., Chen, C.C. et al.:

Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein, rna and dna in experimental tumor cells.

In: Cancer Res. 31 (1971), S. 921.

Lin, J.Y., Ju, S.T., Wu, H.L. et al.:

The binding of abrin and ricin by Ehrlich ascites tumor cells. In: Cancer Res. 33 (1973), S. 2688-2691.

Lis, H., Friedman, C., Sharon, N., Katchalski, E.:

Multiple hemagglutinins in soybeans.

In: Arch. Biochem. Biophys. 117 (1966), S. 301-309.

Lis, H., Sharon, N., Katchalski, E. et al.:

Soybean hemagglutinin, a plant glycoprotein. I.

Isolation of a glycopeptide. In: J. Biol. Chem. 241 (1966), S. 684-689.

Lis, H., Sela, B.A., Sachs, L. et al.:

Specific inhibition by N-acetyl-D-glaktosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces. In: Biochim. biophys. Acta 211 (1970), S. 582-585.

Livingston, R.B., Titus, G.A., Heilbrun, L.K.:

In vitro effects on DNA-synthesis as a predictor of biologic effect from chemotherapy. In: Cancer Res. 40 (1980), S. 2209-2212.

Lotan, R., Skuttelsky, E., Danon, D. et al.:

The purification, composition and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*).

In: Biol. Chem. 250 (1975), S. 8518-8523.

Lustig, S., Fishman, P., Djaldetti, M.:

Topographic changes of membrane receptors for Wheat germ agglutinin during the cell cycle and their relation to cytolysis. In: Exp. Cell Res. 129 (1980), S. 321-328.

Mattern, J., Wayss, K., Volm, M. et al.:

Klinische Bedeutung sogenannter Onkobiogramme für die Chemotherapie von Tumoren.

In: Dtsch. med. Wschr. 107 (1982), S. 1683-1688.

McCune, C.S., Schapira, D.V., Henshaw, E.C.:

Specific immunotherapy of advanced renal carcinoma: evidence for the polyclonality of metastases.

In: Cancer 47 (1981), S. 1984-1987.

Mac Farlane, J.R., Tolley, D.A.:

Intravesical Mitomycin C therapy for superficial bladder cancer. Report of a multicentre phase II study.

In: Br. J. Urol. 57 (1985), S. 37-39.

McKenzie, G.H., Sawyer, W.H.:

The binding properties of dimeric and tetrameric Concanavalin A. Binding of ligands to noninteracting macromolecular acceptors.

In: J. Biol. Chem. 248 (1973), S. 549-556.

Merrin, C., Mittelman, A., Fanous, N. et al.:

Chemotherapy of advanced renal cell carcinoma with Vinblastine and CCNU. In: J. Urol. 113 (1975), S. 21-23.

Mitomycin Produktinformation. Hrg. Medac GmbH, Hamburg, 2/85.

Morrell, R.M.:

Lectin-mediated modulation of lymphocyte functions.

In: Recognition proteins, receptors and probes: invertebrates. Hrg. Liss, A.R., Inc., New York, 1984, S. 149-175.

Murata, F., Tsvyama, S., Suzuki, S. et al.:

Distribution of glycoconjugates in the kidney studied by use of labeled lectins.

In: J. Histochem. Cytochem. 31 (1983), S. 139-144.

Nagata, Y., Burger, M.M.:

Wheat germ agglutinin. Isolation and characterisation.

In: J. Biol. Chem. 247 (1972), S. 2248-2250.

Nagata, Y., Bruger, M.M.:

Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding.

In: J. Biol. Chem. 249 (1974), S. 3116-3122.

Newman, R.A., Klein, P.J., Rudland, P.S.:

Binding of peanut lectin to breast epithelium, human carcinomas and a cultured rat mammary stem cell: use of the lectin as a marker of mammary differentiation.

In: J. nat. Cancer Inst. 63 (1979), S. 1339-1342.

Nicolson, G.L., Blaustein, J.:

The interaction of Ricinus communis agglutinin with normal and tumor cell surfaces.

In: Biochim. Biophys. Acta 266 (1972), S. 543-547.

Nicolson, G.L., Blaustein, J., Etzler, M.E.:

Characterisation of two plant lectins from Ricinus communis and their quantitative interaction with a murine lymphoma.

In: Biochemistry 13 (1974), S. 196-204.

Nicolson, G.L., Lacorbiere, M., Hunter, T.R.:
 Mechanism of cell entry and toxicity of an affinity-purified lectin from *Ricinus communis* and its differential effects on normal and virustransformed fibroblasts.
 In: Cancer Res. 35 (1975), S. 144-155.

Olsnes, S., Refsnes, K., Pihl, A.:
 Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin.
 In: Nature 249 (1974), S. 627-631.

Olsnes, S., Refsnes, K., Christensen, T.B. et al.:
 Studies on the structure and properties of lectins from *abrus precatorius* and *ricinus communis*.
 In: Biochim. Biophys. Acta 405 (1975), S. 1-10.

Olsnes, S., Sandvig, K., Refsnes, K. et al.:
 Binding and uptake of the toxic lectins abrin and ricin by mammalian cells. In: Surface membrane receptors. Interface between cells and their environment.
 Hrg. Brodshaw, R., New York, 1976. S. 179-192.

Otto, U., Klöppel, G., Baisch, H.:
 Transplantation of human renal cell carcinoma into NMRI nu/nu mice. I. Reliability of an experimental tumor model. In: J. Urol. 131 (1984), S. 130-133.

Pappenheimer, A.M., Olsnes, J.R., Harper, A.A.:
 Lectins from *abrus precatorius* and *ricinus communis* I. Immunochemical relationships between toxins and agglutinins. In: J. Immunol. 113 (1974), S. 835-841.

Penta, J.S. et al.:
 Cisplatin. In: Cancer Chemotherapy.
 Hrg. Muggia, F.M., Boston, 1983. S. 149 ff.

Pereira, M.E.A., Kabat, E.A., Sharon, N.:

Immunochemical studies on the specificity of soybean agglutinin. In: Carbohyd. Res. 37 (1974), S. 89-102.

Podder, S.K., Surolia, A., Bachhawat, B.K.:

On the specificity of carbohydrate-lectin recognition. The interaction of a lectin from Ricinus communis beans with simple saccharides and Concanavalin A.

In: Europ. J. Biochem. 44 (1974), S. 151-160.

Powell, A.E., Leon, M.A.:

Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen Concanavalin A.

In: Exp. Cell Res. 62 (1970), S. 315-325.

Preusser, P., Achterrath, W., Niederle, N. et al.:

Cisplatin. In: Arzneimittelter. 2 (1985), S. 50-65.

Rabes, M.R.:

Analysis of proliferation compartments in human tumors.

1. Renal adenocarcinoma. In: Cancer 44 (1979), S. 799-813.

Rajewsky, M.F.:

In vitro studies of cell proliferation in tumors. II. characteristics of a standardised in vitro system for the measurement of H³-thymidine incorporation into tissue explants. In: Europ. J. Cancer 1 (1965), S. 281-287.

Ralph, P., Nakoinz, J.:

Inhibitory effects of lectins and lymphocyte mitogens on murine lymphomas and myelomas.

In: J. nat. Cancer Inst. 51 (1973), S. 883-890.

Refsnes, K., Olsnes, S., Pihl, A. et al.:

On the toxic proteins abrin and ricin. Studies of their binding to and entry into Ehrlich ascites cells.

In: J. Biol. Chem. 249 (1974), S. 3557-3562.

Rehn, L.:

Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern.

In: Arch. Klin. Chir. 50 (1985), S. 588-600.

Reisner, Y., Gachelin, G., Dubois, P. et al.:

Interaction of Peanut agglutinin a lectin specific for nonreducing terminal D-galactosyl residues, with embryonal carcinoma cells.

In: Develop. Biol. 61 (1977), S. 20-27.

Rosenberg, B.:

Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis from a platinum electrode.

In: Nature 205 (1965), S. 698-699.

Roth, J., Neupert, G., Thoss, K.:

Interaction of Lens culinaris lectin, Concanavalin A, Ricinus communis agglutinin and Wheat germ agglutinin with the cell surface of normal and transformed rat liver cells. In: Exp. Path. 10 (1975), S. 309-317.

Roth, J.:

The Lectins. Molecular probes in cell biology and membrane research. 1. Auflage, VEG G. Fischer Jena, 1978.

Salmon, S.E., Hamburger, A.N., Soehnlen, B.S. et al.:

Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anti-cancer drugs.

In: New Engl. J. Med. 298 (1978), S. 1321-1327.

Schmiedt, E., Rattenhuber, U., Wieland, W.:

Parenchymatöse Nierentumoren. In: Urologie in der Praxis Band I. Hrg. Hohenfellner, R., Zingg, E.J., Thieme Stuttgart, New York, 1982. S. 490-508.

Schulte, B.A., Spicer, S.S.:

Histochemical evaluation of mouse and rat kidneys with lectin-horseradish peroxidase conjugates.

In: Amer. J. Anat. 168 (1983), S. 345-362.

Seeber, S.:

Molekulare, zelluläre und klinische Pharmakologie von Adriamycin. In: Beiträge zur Onkologie 9. Hrg. Füllentbach, D., Nagel, G.A., Seber, S., Karger Basel, 1981.

S. 1-15.

Seeber, S., Schmidt, C.G.:

Zum Problem der prätherapeutischen Sensibilitätsbestimmung von Tumoren durch Inkorporationsstudien in vitro.

In: Klin. Wschr. 55 (1977), S. 1127-1136.

Sela, B., Lis, H., Sharon, N. et al.:

Different locations of carbohydrate-containing sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. In: Membr. Biol. 3 (1970), S. 267-279.

Sharon, N., Lis, H.:

Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins.

In: Science 177 (1972), S. 949-959.

Sjeljedid, R., Ericsson, J.L.E.:

Electron microscopic observation on specializations of the cell surface in renal clear cell carcinoma.

In: Lab. Invest. 14 (1965), S. 435-447.

Skinner, D.G., Colvin, R.B., Vermillion, C.D.,

Pfister, R.C. et al.:

Diagnosis and management of renal cell carcinoma.

In: Cancer 28 (1971), S. 1165-1177.

Smyth, J.F., Robins, A.B., Leese, C.L.:

The metabolism of cytosine arabinoside as a predictive test for clinical response to the drug in acute myeloid leukaemia. In: Europ. J. Cancer 12 (1976), S. 567-573.

Sperti, S., Montanaro, L., Mattiolo, A. et al.:

Inhibition by ricin of protein synthesis. In vitro: 60 S ribosomal subunit as the target of the toxin.

In: Biochem. J. 136 (1973), S. 813-815.

Stähelin, H., Trippmacher, A.:

Cytostatic activity of Chlamydocin, a rapidly inactivated cyclic tetrapeptide. In: Europ. J. Cancer 10 (1974), S. 801-808.

Stambolis, Ch., Doppl., W., Pust, R. et al.:

Das Nierenzellkarzinom. In: Med. Welt 32 (1981), S. 1283-1288.

Steel, G.G., Adams, K.:

Stem-cell survival and tumor control in the Lewis lung carcinoma. In: Cancer Res. 35 (1975), S. 1530.

Steel, G.G.:

The growth and therapeutic response of human tumors in immune deficient mice. In: Cancer Bull. 65 (1978), S. 465 ff.

Steele, G.jr., Wang, B.S., Richie, J.P. et al.:

Results of xenogenic /-rna therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma.

In: Cancer 47 (1981), S. 1286-1288.

Sternberg, C.N., Yagoda, A., Scher, H.I. et al.:

Preliminary results of M-Vac (Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin and Cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium.

In: J. Urol. 133 (1985), S. 403-407.

Sufrin, G., Murphy, G.P.:

Renal adenocarcinoma. In: Urol. Surv. 30 (1980), S. 129-144.

Takayama, H.:

Distribution of Concanavalin A binding sites on normal human urinary bladder mucosa and bladder tumors by transmission and scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. In: Urol. Res. 12 (1984), S. 135-141.

Talley, R.W.:

Chemotherapy of adenocarcinoma of the kidney.
In: Cancer 32 (1973), S. 1062-1071.

Tannenbaum, M.:

Ultrastructural pathology of human renal cell tumors.
In: Path. Annu. 6 (1971), S. 249-277.

Uhlenbruck, G., Pardoe, G.I., Bird, G.W.:

On the specificity of lectins with a broad agglutinin spectrum. II. studies on the nature of the T-antigen and the specific receptors for the lectin of *Arachis hypogaea* (ground-nut.). In: Z. Immunitätsforsch. 138 (1969), S. 423-433.

Vierbuchen, M., Klein, P.J., Uhlenbruck, G. et al.:

The significance of lectin receptors in the kidney and in hypernephroma. In: Recent Results Cancer Res. 75 (1980), S. 68-76.

Volm, M., Kaufmann, M., Hinderer, H., Goerttler, K.:

Schnellmethode zur Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegenüber Zytostatika. In: Klin. Wschr. 48 (1970), S. 374-376.

Volm, M., Kaufmann, M., Wayss, K. et al.:

Gezielte Tumorchemotherapie durch Onkobiogramme.
In: Dtsch. med. Wschr. 99 (1974), S. 38-43.

Volm, M., Wayss, K., Kaufmann, M. et al.:

Praetherapeutic detection of tumor resistance and the results of tumor chemotherapy.

In: Europ. J. Cancer 15 (1979), S. 983-993.

Wada, S.M., Pallansch, J., Liener, I.E.:

Chemical composition and end groups of the soybean hemagglutinin. In: J. Biol. Chem. 233 (1958), S. 395-400.

Walker-Nasir, E., Jeanloz, R.W.:

Inhibitory activity of disaccharide-L-asparagine compounds against hemagglutination by various lectins.

In: Carbohydr. Res. 98 (1981), S. 157-163.

Wang, J.L., Cunningham, B.A., Edelman, G.M.:

Unusual fragments in the subunit structure of Concanavalin A. In: Proc. nat. Acad. Sci. USA 68 (1971), S. 1130-1134.

Wayss, K., Mattern, J., Volm, M. et al.:

Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit von Tumoren.

In: Arch. Geschwulstforsch. 44 (1974), S. 307-311.

Weisenthal, L.M.:

In vitro assay in preclinical antineoplastic drug screening. In: Semin. Oncol. 8 (1981), S. 362-376.

Wennerberg, J.:

Cell cycle perturbations in heterotransplanted squamous cell carcinoma of the head and neck after Mitomycin C and Cisplatin treatment. In: Int. J. Cancer 33 (1984), S. 213-222.

Wolberg, W.H.:

Biochemical approaches to prediction of response in solid tumors. In: Nat. Cancer Inst. Monogr. 34 (1971), S. 189-195.

Wong, P.P., Yagoda, A., Currie, V.E. et al.:

Phase II study of Vindesine sulfate in the therapy for advanced renal cell carcinoma. In: Cancer Treatm. Rep. 61 (1977), S. 1727-1729.

Wright, J.C., Cobb, J.P., Gunport, S.L. et al.:

Further investigation of the relation between clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. In: Cancer 15 (1962), S. 284-293.

Wüst, G.P., Matthes, K.J.:

In vitro-Messung des Einbaus von H³-Thymidin in Jensen-sarkome unter Cytostatikaeinwirkung mit Hilfe der Flüssigkeits-Spectrometrie. In: Z. Krebsforsch. 73 (1970), S. 204-214.

Yagoda, A.:

Chemotherapy of metastatic bladder cancer.
In: Cancer 45 (1980), S. 1879-1888.

Yawata, T., Hara, T., Tsukamoto, I. et al.:

Toxic effects of Kintoki bean (Phaseolus vulgaris) lectin on cultured animal cells.
In: Jr. nutr. Sci. Vitam. 29 (1983), S. 65-74.

Zeile, G.:

Symposium über biologisch aktive Substanzen in der Krebstherapie. In: Ärztl. Rheinl.-Pf. 3 (1985), S. 117-118.

Zingg, E.J.:

Maligne Tumoren der Harnblase. In: Urologie in der Praxis, Band I. Hrg. Hohenfellner, R., Zingg, E.J., Thieme Stuttgart, 1982. S. 520-554.

Zwelling, L.A.:

Cisplatin. In: Pharmacological principles of Cancer treatment. Hrg. Chabner, B., Saunders, W.B. Comp. Philadelphia, 1982. S. 309 ff.

Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie die gute Betreuung während der Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. Eduard Becht und Herrn Dr. Thomas Schärfe, Urologische Klinik der Universität Mainz, herzlichst bedanken.

Auch Herrn Professor Dr. Rolf Kreienberg, Oberarzt an der Frauenklinik der Universität Mainz, gilt mein Dank für die Benutzung seiner Labors zu Beginn der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Angelika Götz, Petra König und Almuth Stubbs für ihre Hilfe bei labortechnischen Problemen bedanken.

Bei Herrn Assistenz-Professor Dr. M.A. Bazeed, Urologisches und Nephrologisches Zentrum Mansoura, Ägypten, und Herrn Privatdozent Dr. Joachim Thüroff, Oberarzt an der Urologischen Klinik der Universität Mainz, bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die mich im Laufe der Arbeit in irgendeiner Weise unterstützt haben.

Lebenslauf

Am 12. Mai 1959 wurde ich, Jürgen Hans Schmidt, als dritter Sohn des Hans-Günther Schmidt und seiner Frau Gisela, geb. Hültenschmidt, in Berlin-Tempelhof geboren.

Von 1966 bis 1969 besuchte ich die Grundschule, Johannes Maaß-Schule, in Wiesbaden.

Von 1969 bis 1978 ging ich in die Oranienschule, Gymnasium in Wiesbaden, wo ich im Juni 1978 das Abitur ablegte.

Von 1978 bis 1979 absolvierte ich meinen Grundwehrdienst im Sanitätsbataillon 2 in Marburg, wo ich als Hauptgefreiter der Reserve ausschied.

Von 1979 bis 1981 durchlief ich bei der Hoechst AG, Frankfurt am Main, die Ausbildung zum Industriekaufmann (Pharmabereich), die ich 1981 mit der Kaufmannsgehilfenprüfung erfolgreich abschloß.

Seit dem Wintersemester 1980/81 bin ich als ordentlicher Student der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz immatrikuliert.

Im März 1983 legte ich dort die ärztliche Vorprüfung, im März 1984 den ersten Teil der ärztlichen Prüfung, im März 1986 den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung und im Mai 1987 den dritten Teil der ärztlichen Prüfung ab.

Wilhelminenstraße 27, 6200 Wiesbaden, im Frühjahr 1987

